



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 620 283 A1**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: **94105141.9**

(22) Anmelddatum: **31.03.94**

(51) Int. Cl.5: **C12Q 1/32, C12Q 1/26,
C12Q 1/54, C07D 487/04,
C07D 513/04, // (C07D487/04,
235:00,231:00), (C07D487/04,
249:00,231:00), (C07D513/04,
277:00,231:00)**

(33) Priorität: **08.04.93 DE 4311464**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
19.10.94 Patentblatt 94/42

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL
PT SE**

(71) Anmelder: **BOEHRINGER MANNHEIM GMBH**

D-68298 Mannheim (DE)

(72) Erfinder: **Hoenes, Joachim, Dr.
Rodauer Strasse 50A
D-64673 Zwingenberg (DE)**
Erfinder: **Unkrig, Volker, Dr.
Stahlbühlring 27
D-68526 Ladenburg (DE)**

(54) **Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung eines Analyten mit einer PQQ-abhängigen Dehydrogenase.**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung eines Analyten mittels enzymatischer Oxidation mit einer PQQ-abhängigen Dehydrogenase in Gegenwart eines Elektronenakzeptors aus der Gruppe der elektronenreichen aromatischen Nitrosoverbindungen durch enzymatische Reduktion der Nitrosoverbindung zu einer Iminoverbindung und Nachweis der Iminoverbindung durch Farbbildung. Ferner betrifft die Erfindung ein entsprechendes Mittel, das eine PQQ-abhängige Dehydrogenase, eine elektronenreiche aromatische Nitrosoverbindung sowie gegebenenfalls ein Nachweisreagenz für Iminoverbindungen enthält. Außerdem betrifft die Erfindung neue Nitrosoaminoverbindungen, die bei Reduktion farbige Chinondiimine bilden sowie deren Verwendung zur kolorimetrisch enzymatischen Bestimmung eines Analyten.

EP 0 620 283 A1

BEST AVAILABLE COPY

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung eines Analyten mittels enzymatischer Oxidation mit einer PQQ-abhängigen Dehydrogenase in Gegenwart eines Elektronenakzeptors aus der Gruppe der elektronenreichen aromatischen Nitrosoverbindungen und Bestimmung des reduzierten Elektronenakzeptors durch Farbbildung als Maß für die Menge des Analyten. Weiter betrifft die Erfindung
 5 ein Mittel zur kolorimetrischen Bestimmung eines Analyten durch enzymatische Oxidation, enthaltend eine PQQ-abhängige Dehydrogenase, eine elektronenreiche aromatische Nitrosoverbindung sowie ein farbbildendes nichttoxisches Nachweisreagenz für die aus der elektronenreichen, aromatischen Nitrosoverbindung bei Reduktion entstehende Iminoverbindung. Weiter betrifft die Erfindung neue Nitrosoanilinverbindungen, deren Herstellung, sowie deren Verwendung zur kolorimetrischen enzymatischen Bestimmung eines Analyten.
 10

Enzymatische Oxidationen ermöglichen in der Analytik den Nachweis und die Bestimmung von Substanzen in verschiedensten Probenmaterialien. Hierbei wirkt ein oxidierendes Enzym in Gegenwart eines die Elektronen der Oxidationsreaktion aufnehmenden Akzeptors auf ein entsprechendes Enzymsubstrat ein. Die Reduktion des Elektronenakzeptors zeigt die Anwesenheit des Enzymsubstrats an. Hierbei hat es sich
 15 bisher als besonders vorteilhaft erwiesen, wenn der reduzierte Elektronenakzeptor durch Farbbildung nachgewiesen werden kann, da dies nicht notwendigerweise nur mittels teurer Meßapparaturen möglich ist, sondern gegebenenfalls auch visuell erfolgen kann.

Bekannte Methoden zur kolorimetrischen Bestimmung von Substanzen mittels oxidierend wirkender Enzyme verwenden Oxidasen oder Dehydrogenasen. Beide Enzymgruppen gehören zur Hauptgruppe der Oxidoreduktasen (Römpps Chemielexikon, Francksche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, 8. Auflage, 1985, Band 4, Seite 2952; Lexikon Biochemie, Herausgeber H. D. Jakubke, Verlag Chemie, Weinheim, 2. Auflage, 1981, Seite 194), deren Mitglieder nach ihren natürlichen Elektronenakzeptoren unterschieden werden können.

Natürlicher Elektronenakzeptor für Oxidasen ist molekularer Sauerstoff (Römpps Chemielexikon, 25 Francksche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, 8. Auflage, 1985, Band 4, Seite 2946). Bei Analytbestimmungen wird dabei der Analyt durch eine Oxidase und O₂ oxidiert. Das entstehende H₂O₂ wird mit Hilfe von Peroxidase zur Oxidation eines Leukofarbstoffes benutzt. Stellvertretend für den Stand der Technik des Einsatzes von Oxidasen zur kolorimetrischen Bestimmung von Analyten sei A. Kunst et al. in "Methods in enzymatic analysis", Hrsg. H. U. Bergmeyer, Verlag Chemie, Weinheim, 3. Auflage, 1984, Band 6, Seite 30 178 - 185 zitiert. Glucose wird dort in Serum, Plasma oder in deproteiniertem Blut durch Umsetzung mit Glucoseoxidase und Luftsauerstoff in wässriger Lösung nachgewiesen, indem das bei dieser Reaktion durch Reduktion des Sauerstoffs gebildete Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Peroxidase reduziert wird und damit farbbildend auf ebenfalls in der Reaktionsmischung vorliegendes Phenol und 4-Aminophenazon wirkt. Das hohe Redoxpotential von H₂O₂ und die Unselektivität und Instabilität von Peroxidase führen meist zu Einschränkungen solcher Tests. Störend wirken zum Beispiel Übergangsmetallionen oder Häm oder Hämproteine, wie sie leicht in von Blut abgeleiteten Proben auftreten können, weil sie Wasserstoffperoxid zersetzen. Probeninhaltsstoffe, zum Beispiel Bilirubin oder auch Medikamente wie zum Beispiel Methyldopa, die durchaus in von Blut abgeleiteten Proben oder in Urin vorkommen, können mit Wasserstoffperoxid und Peroxidase zu einer Farbbildung und somit zu falschen Resultaten führen; sie können aber auch schon gebildeten Farbstoff wieder reduzieren und damit entfärben.
 35

Insbesondere bei Durchführung der vorgenannten Bestimmungsmethode auf festen Trägern, in sogenannten Trockentests, hat sich der Sauerstoffbedarf der Oxidasen zusätzlich als nachteilig erwiesen. Vor allem dann, wenn viel Sauerstoff zur Oxidation hoher Konzentrationen an Enzymsubstrat gebraucht wird, kann die Diffusion von Sauerstoff aus der Luft in das Reaktionsmedium zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt werden und zu langen Reaktionszeiten oder insbesondere bei kinetischen Bestimmungsmethoden zu falschen Ergebnissen führen.

Dehydrogenasen können im allgemeinen in solche unterteilt werden, die für die Oxidation von Enzymsubstraten Nikotinamid-adenin-dinucleotid(NAD) oder Nikotinamid-adenin - dinucleotid -phosphat (NADP) als natürlichen unmittelbaren Elektronenakzeptor benötigen und in solche, die nicht-NAD oder -NADP-abhängig sind und die also andere Substanzen als natürliche, unmittelbare Elektronenakzeptoren bei enzymatischen Oxidationsreaktionen verwenden. Unter die Gruppe der nicht-NAD- oder -NADP-abhängigen Dehydrogenasen fallen insbesondere die PQQ- und flavin-abhängigen Dehydrogenasen.
 50

Der Einsatz von NAD-abhängigen Dehydrogenasen für kolorimetrische Messungen ist zum Beispiel aus DE-A-2147466 bekannt. Dort wird beschrieben, daß Lactat unter Katalyse von Lactatdehydrogenase mit Nikotinamid-adenin-dinucleotid zu Pyruvat und reduziertem Nikotinamid-adenin-dinucleotid umgesetzt wird. Das gebildete NADH reagiert dann beispielsweise in Gegenwart des Enzyms Diaphorase mit Tetrazoliumsalzen unter Bildung von NAD und farbigen Formazanen, deren Konzentration photometrisch bestimmt werden kann. Anstatt Diaphorase ist auch N-Methylphenazinium-methosulfat als Reduktionskatalysator für
 55

die Übertragung der Elektronen von NADH auf das Tetrazoliumsalz genannt.

Nachteile dieses Verfahrens sind darin zu sehen, daß statt NADH auch andere eventuell in biologischen Proben, wie zum Beispiel Blut, Serum, Plasma oder Urin vorkommende, reduzierend wirkende Substanzen, wie Glutathion oder Medikamente wie Methyl-dopa oder Dobesylat in Gegenwart von unspezifischen

5 Reduktionskatalysatoren, wie Diaphorase oder N-Methylphenazinium-methosulfat Tetrazoliumsalze in entsprechende Formazane überführen und so zu falsch-positiven Ergebnissen führen, obwohl sie in Abwesenheit von Reduktionskatalysatoren nicht so schnell mit Tetrazoliumsalzen reagieren würden.

Aus EP-A-0 354 441 ist der oxidative, enzymatische Nachweis von Analyten mittels flavinabhängiger Qoxidase oder nicht-NAD-abhängiger Dehydrogenasen, wie PQQ-abhängigen Dehydrogenasen, mit elektronenreichen aromatischen Nitrosoverbindungen bekannt. Bei dieser Nachweismethode wird die aromatische Nitrosoverbindung enzymatisch zu einem entsprechenden elektronenreichen, aromatischen Amin reduziert,

10 das entweder mittels einer ausgefällten, schwer löslichen Heteropolysäure durch Heteropolyblaubildung nachgewiesen wird oder mit einem Kupplungsreagenz in Gegenwart eines Oxidationsmittels zu einem Farbstoff gekuppelt wird. Die blau-grauen Farbabstufungen der Heteropolyblaubildung sind für eine genaue visuelle Auswertung allerdings wenig geeignet. Zum kolorimetrischen Nachweis der im allgemeinen nicht

15 oder nur sehr schwach gefärbten aromatischen Aminoxydationen mit einem fargebenden Kupplungsreagenz ist nachteilig, daß zusätzlich ein Oxidationsmittel benötigt wird. Da ein solches Oxidationsmittel die enzymatische Reduktion der aromatischen Nitrosoverbindung zum aromatischen Amin stören würde, muß die Nachweisreaktion in zwei getrennten Stufen erfolgen: in der ersten Stufe wird die aromatische Nitrosover-

20 bindung enzymatisch zum aromatischen Amin reduziert und in einer davon getrennten zweiten Stufe ein Oxidationsmittel für die oxidative Kupplung des aromatischen Amins mit einem fargebenden Kupplungsreagenz zugegeben.

Ein weiterer Nachteil dieses Nachweisverfahrens besteht darin, daß für die Reduktion jedes Äquivalents einer aromatischen Nitrosoverbindung zu einem aromatischen Amin zwei Äquivalente des Analyten oxidiert werden müssen. Dies kann insbesondere bei geringen Analytkonzentrationen zu einer unbefriedigenden Empfindlichkeit eines solchen Nachweisverfahrens führen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, die vorgenannten Nachteile des Standes der Technik zu beseitigen und ein einfacheres, weniger störanfälliges, empfindlicheres und optisch besser auswertbares Verfahren und Mittel zum oxidativen Nachweis von Analyten zur Verfügung zu stellen, das insbesondere in

30 einer Stufe durchgeführt werden kann und über den gesamten sichtbaren Wellenlängenbereich visuell gut auswertbare Farben liefert.

Die Aufgabe wird gelöst durch die Erfindung wie sie in den Ansprüchen charakterisiert ist.

Demgemäß wurde ein Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung eines Analyten mittels enzymatischer Oxidation des Analyten mit einer Oxidoreduktase in Gegenwart eines direkten Elektronenakzeptors

35 aus der Gruppe der elektronenreichen aromatischen Nitrosoverbindungen gefunden, bei dem die Bestimmung des reduzierten Elektronenakzeptors durch Farbbildung als Maß für die Menge des Analyten erfolgt, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die elektronenreiche aromatische Nitrosoverbindung unter Oxidation des Analyten in Anwesenheit einer PQQ-abhängigen Dehydrogenase zu einer Iminoverbindung reduziert wird und diese ohne enzymatische Weiterreduktion zum aromatischen Amin durch Farbbildung nachgewiesen wird.

Insbesondere ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung eines Analyten mit einer Oxidoreduktase in Gegenwart eines direkten Elektronenakzeptors aus der Gruppe der elektronenreichen aromatischen Nitrosoverbindungen, bei dem die Bestimmung des reduzierten Elektronenakzeptors durch Farbbildung als Maß für die Menge des Analyten erfolgt, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die elektronenreiche aromatische Nitrosoverbindung unter Oxidation des Analyten in Anwesenheit einer PQQ-abhängigen Dehydrogenase zu einer Iminoverbindung reduziert wird und diese statt einer enzymatischen Weiterreduktion zum aromatischen Amin durch Reaktion mit einem fargebenden nichtoxidativen Nachweisreagenz kolorimetrisch bestimmt wird.

45 Außerdem wurde ein Mittel zur kolorimetrischen Bestimmung eines Analyten durch enzymatische Oxidation des Analyten enthaltend eine PQQ-abhängige Dehydrogenase und einen direkten Elektronenakzeptor aus der Gruppe der elektronenreichen, aromatischen Nitrosoverbindungen gefunden, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es entweder eine elektronenreiche aromatische Nitrosoverbindung enthält, die bei enzymatischer Reduktion eine farbige Iminoverbindung bildet oder daß es weiterhin ein fargebendes nichtoxidatives Nachweisreagenz für die aus der elektronenreichen aromatischen Nitrosoverbindung durch Reduktion entstehende Iminoverbindung enthält.

Erfnungsgemäß wird unter "Analyt" eine solche Substanz verstanden, die enzymatisch oxidiert wird. In vielen Fällen wird der Analyt diejenige Substanz sein, die in der zu untersuchenden Probe direkt nachgewiesen oder quantitativ bestimmt werden soll. Beispielsweise kann Glucose direkt mit PQQ-

abhängiger Glucosedehydrogenase (Glucose-dye-oxidoreduktase) oxidiert und kolorimetrisch bestimmt werden. Es ist jedoch auch möglich, daß der Analyt erst durch eine oder mehrere vorgeschaltete Reaktionen aus einer anderen Substanz gebildet wird, sodaß durch kolorimetrische Bestimmung des Analyten indirekt auf die Konzentration der Ausgangssubstanz geschlossen werden kann.

5 Der Analyt ist in der vorliegenden Erfindung diejenige Substanz, die als Substrat der eingesetzten PQQ-abhängigen Dehydrogenase akzeptiert wird.

PQQ-abhängige Dehydrogenasen enthalten als Cofaktor Pyrrolchinolinchinon. Eine Übersicht über solche "Chinoproteine" gibt J. A. Jongejahn et al. in "PQQ and Quinoproteins", Kluver Academic Publ. Dordrecht, Niederlande 1989. Beispiele für erfindungsgemäß einsetzbare Enzyme sind PQQ-abhängige

10 Glucosedehydrogenase (Glucose-dye-oxidoreductase, E.C 1.1.1.50/1.1.1.91/1.1.1.97), Alkoholdehydrogenase oder Lactatdehydrogenase. In dem erfindungsgemäßen Verfahren kann insbesondere die PQQ-abhängige Glucosedehydrogenase vorteilhaft für die kolorimetrische Bestimmung von Glucose eingesetzt werden.

Als direkte Elektronenakzeptoren, die die Elektronen von dem Enzym/Cofaktorsystem Dehydrogenase/PQQ übernehmen, werden elektronenreiche aromatische Nitrosoverbindungen eingesetzt, wie sie als Elektronenakzeptoren für Oxidasen und nicht-NADH-abhängige Dehydrogenasen aus EP-A-0 354 441 und EP-A-0 441 222 bekannt sind und bei denen eine Nitrosogruppe unmittelbar an einen elektronenreichen aromatischen Kern gebunden ist. "Direkte" Elektronenakzeptoren heißt, daß die Elektronen enzymkatalysiert direkt, ohne die Notwendigkeit eines Reduktionskatalysators, vom Enzym/Cofaktorsystem übernommen werden.

20 Im erfindungsgemäßen Sinne als reduzierbare elektronenreiche aromatische Nitrosoverbindungen einsetzbare Verbindungen sind solche, die die Elektronen, die bei der Oxidation des eingesetzten PQQ-abhängigen Dehydrogenase entsprechenden Substrates anfallen, von dem Enzym übernehmen und dabei Iminoverbindungen bilden. Eine entsprechende Iminoverbindung enthält eine Iminogruppe = NH, die über ihre Doppelbindung an den vormals aromatischen Kern gebunden ist und mit dessen Doppelbindungselektronen in Konjugation steht. Elektronenreiche aromatische Nitrosoverbindungen enthalten einen oder mehrere elektronenliefernde Reste oder Gruppen am oder im aromatischen Kern, die die Bildung einer Iminoverbindung begünstigen, indem sie durch Elektronenabgabe über den vormals aromatischen Kern mit der Iminogruppe in Konjugation treten.

Dies sind zum einen Substituenten, die einen +M Effekt auf den aromatischen Kern ausüben.

30

Reduktion

Z. B.



35

Beispiele für an einen aromatischen Kern gebundene Reste R mit +M-Effekt sind Substituenten wie Hydroxy-, Alkoxy-, Aryloxy-, Alkylthio-, Arylthio-, Amino-, Monoalkylamino-, Monoarylarnino-, Dialkylamino- und Diarylaminoreste.

40 Im Fall von Nitrosobenzolderivaten zeigen diese Substituenten beispielsweise dann besonders ihre Wirkung, wenn sie in ortho und/oder in para-Position zur Nitrosogruppe stehen.

Gruppen mit elektronenliefernden und eine Iminstruktur begünstigenden Effekt können auch Bestandteil eines heteroaromatischen Ringsystems sein.

45 Beispiele sind heterocyclische aromatische Nitrosoverbindungen mit einem π -Elektronenüberschuß, in denen das aromatische Ringsystem so elektronenreich ist, daß ein externer +M-Substituent für die Ausbildung einer mesomeriestabilisierten Imingruppe nach der Reduktion entbehrlich ist. Der π -Elektronenüberschuß resultiert daraus, daß mehr aromatische π -Elektronen vorhanden sind als Ringatome, über die sich die π -Elektronen verteilen können. Derartige Heterocyklen sind dem Fachmann bekannt.

Beispiele für solche aromatischen Heterocyklen sind Antipyrin, Pyrazolo-Heterocyclen und Pyrazole.

50 Der Elektronenreichtum der erfindungsgemäß eingesetzten elektronenreichen aromatischen Nitrosoverbindungen hat den zusätzlichen Effekt, daß diese Nitrosoverbindungen zu einem gewissen Teil über Keto-Enol-Tautomerie mit der äquivalenten Oximgrenzstruktur im Gleichgewicht stehen.



55 Beide Tautomeriegrenzstrukturen sollen im Rahmen der Erfindung mit dem Begriff "aromatische Nitrosoverbindungen" als erfindungsgemäß einsetzbare Substanzen umfaßt sein.

Bei den vorstehend genannten +M-Substituenten sind Alkoxy-, Alkylthio-, Monoalkylamino- und Dialkylaminoreste Reste, in denen Alkyl einen Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen darstellt, der

seinerseits durch eine Hydroxygruppe, eine gegebenenfalls ein- oder mehrfach durch Alkyl mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen substituierte Aminogruppe, PO_3H_2 , SO_3H oder CO_2H substituiert sein kann. Die Säurereste PO_3H_2 , SO_3H und CO_2H können als solche oder in Salzform als Ammonium-, Alkali- oder Erdalkalisalze vorliegen.

5 Aryloxy- und Arylthioreste enthalten aromatische Reste mit 6 bis 10 Kohlenstoffatomen, wobei Phenoxy- und Phenylthioreste besonders bevorzugt sind.

Ammoniumsalze sind solche, die das Ammoniumion NH_4^+ enthalten oder solche, die ein- oder mehrfach durch Alkyl-, Aryl- oder Aralkylreste substituierte Ammoniumkationen enthalten. Alkyl in Alkyl- und Aralkylresten bedeutet einen Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen. Aryl in Aryl- und Aralkylresten ist ein 6 bis 10 Kohlenstoffatome zählendes aromatisches Ringsystem, wobei Phenyl bevorzugt ist. Ein bevorzugter Aralkylrest ist Benzyl.

Alkalosalze sind vorzugsweise solche des Lithiums, Natriums oder Kaliums. Erdalkalisalze sind vorzugsweise solche des Magnesiums oder Calciums.

Die im vorstehenden angegebenen Beispiele für +M-Substituenten sollen nicht als vollständige Aufzählung verstanden werden. Der Fachmann wird im Einzelfall wissen, ob ein gegebener Rest R ein +M-Substituent ist und an welcher Stelle er an einem aromatischen System diese Wirkung ausübt, oder welche aromatischen Heterozyklen im Ringsystem eine entsprechende Gruppierung enthalten und insofern sollen alle diese Reste mögliche Substituenten in aromatischen Nitrosoverbindungen sein, die gemäß der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden können.

20 Das aromatische Grundgerüst der einzusetzenden aromatischen Nitrosoverbindung stellt bevorzugt einen elektronenreichen aromatischen Ring von 5 - 7, besonders bevorzugt 5 - 6 Kohlenstoff- oder Heteroatomen dar, der mit einem oder zwei aromatischen oder/und alicyclischen Ringen anelliert sein kann. Für die aromatischen anellierten Ringe kommen dabei sowohl kohlenstoffaromatische Systeme als auch heteroaromatische Systeme mit je 5 - 7 bevorzugt 5 - 6 Kohlenstoff- oder Heteroatomen in Frage.

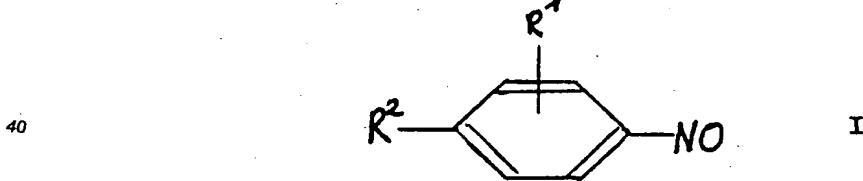
25 Unter alicyclischen Ringen werden gesättigte oder ungesättigte Cycloaliphaten mit 5 - 7 Kohlenstoffatomen oder Heteroatomen, vorzugsweise 5 oder 6 Kohlenstoffatomen verstanden. Unter Heteroatomen wird Stickstoff, Sauerstoff oder Schwefel verstanden.

Bevorzugte, erfundungsgemäß einsetzbare Nitrosoverbindungen sind Nitrosobenzolderivate.

Unter Nitrosobenzolderivaten wird auch Nitrosobenzol verstanden, das mit einem oder mehreren 30 aromatischen oder/und alicyclischen Ringen anelliert ist. Als aromatische Ringe kommen hierbei sowohl kohlenstoffaromatische Systeme als auch Heteroaromaten mit je 5 - 7, bevorzugt 5 oder 6 Ringatomen in Frage. Beispiele sind anellierte Benzol- oder Naphthalinringe oder ein anellierter Pyridinring.

Besonders bevorzugt sind Nitrosobenzolderivate der allgemeinen Formel I

35



wobei R^1

45 Wasserstoff, Hydroxy, Alkyl gegebenenfalls substituiert durch Hydroxy, COOH , PO_3H_2 , oder SO_3H , Alkoxy, Alkylthio, Aryloxy, Arylthio, Halogen, oder Amino, das gegebenenfalls ein oder mehrfach durch Alkyl, gegebenenfalls substituiert durch Hydroxy, PO_3H_2 , Dialkylphosphinyl, SO_3H oder CO_2H , substituiert ist, bedeutet und R^2

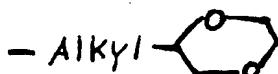
50 eine Hydroxygruppe, , Alkoxy-, , Aryloxy-, Arylthio- oder Alkylthiogruppe bedeutet, wobei der Alkylrest gegebenenfalls seinerseits durch eine Hydroxygruppe, eine Alkoxygruppe, eine gegebenenfalls ein- oder mehrfach durch Alkyl substituierte Aminogruppe, PO_3H_2 , SO_3H oder CO_2H als solche oder in Salzform als Ammonium-, Alkali- oder Erdalkalisalze substituiert ist, oder eine Aminogruppe NR^3R^4 bedeutet,

55 in der R^3 und R^4 gleich oder verschieden sein können, und Wasserstoff, eine Aryl- oder Alkylgruppe, die ihrerseits durch eine Hydroxy-, Alkoxy-, Hydroxylalkoxy-, eine gegebenenfalls hydroxysubstituierte Polyalkoxygruppe, PO_3H_2 , SO_3H , COOH als solche oder in Salzform oder durch eine gegebenenfalls ein oder mehrfach durch Alkyl substituierte Aminogruppe substituiert sein kann, bedeutet, oder in der R^3 und R^4 einen Alkylenrest darstellen können, der gegebenenfalls durch Sauerstoff, Schwefel oder

Stickstoff unterbrochen ist, wobei Stickstoff durch einen Alkyl-, Hydroxalkyl-, Hydroxyalkoxyalkyl-, Alkoxyhydroxalkyl-, Alkoxy carbonylalkyl, Dioxanyl-alkyl- oder Polyalkoxyalkylrest substituiert ist, der seinerseits jeweils gegebenenfalls im Alkylteil durch einen Hydroxyrest substituiert sein kann, oder wenn R¹ in ortho-Stellung zu NR³R⁴ steht, R³ oder R⁴ auch zusammen mit R¹ einen Alkylenrest darstellen kann.

5 Hierbei bedeutet Halogen Fluor, Chlor, Brom oder Jod. Fluor und Chlor sind besonders bevorzugt.
 10 Alkyl in Alkyl, Alkoxy oder Alkylthio bedeutet einen Kohlenwasserstoffrest mit 1 - 6 Kohlenstoffatomen, Reste mit 1 - 3 Kohlenstoffatomen sind besonders bevorzugt. Die für Alkyl vorstehend gegebene Definition trifft auch für den Alkylteil in Hydroxalkyl-, Dialkylaminoalkyl-, Hydroxyalkoxyalkyl-, Alkoxyalkyl-, Polyalkoxyalkyl-, Alkoxy-hydroxalkyl- und Dioxanyl-alkylresten zu. Ein Dioxanyl-alkylrest ist ein Rest, bei dem ein Dioxanringssystem an einen Alkylrest gebunden ist. Vorzugsweise handelt es sich um ein 1,4-Dioxanringssystem, d. h.

15



Ein Polyalkoxyalkylrest ist ein Rest
 20 -Alkyl- (Alkoxy)_n-Alkoxy mit n = 1 - 10. Bevorzugt ist n = 1 - 4. Besonders bevorzugt ist n = 1 - 3. Ein Alkylenrest ist eine geradkettige oder verzweigte - vorzugsweise geradkettige -, gesättigte oder ungesättigte - vorzugsweise gesättigte-, Kohlenwasserstoffkette aus 2 - 5, vorzugsweise 2 - 4 C-Atomen, mit zwei freien Bindungsstellen.

25 Aryl in Aryl- und Aralkylresten ist ein 6 bis 10 Kohlenstoffatome zählendes aromatisches Ringsystem, wobei Phenyl bevorzugt ist.

Ammoniumsalze sind solche, die das Ammoniumion NH₄⁺ enthalten oder solche, die ein- oder mehrfach durch Alkyl-, Aryl- oder Aralkylreste substituierte Ammoniumkationen enthalten.

Alkalosalze sind vorzugsweise solche des Lithium, Natriums oder Kaliums. Erdalkalosalze sind vorzugsweise solche des Magnesiums oder Calciums.

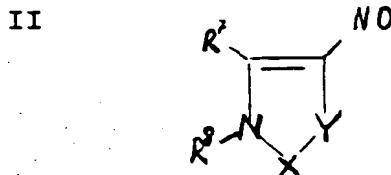
30 Bevorzugte Reste R¹ sind Wasserstoff und Alkyl, insbesondere Wasserstoff.
 Bevorzugte Reste R² sind Alkoxyreste und die Aminogruppe NR³R⁴.
 In der Bedeutung eines von R¹ und R³ durch Sauerstoff, Schwefel oder Stickstoff unterbrochenen Alkylenrestes ist der durch Einbeziehung des Stickstoffatoms der allgemeinen Formel I gebildete Morpholin- bzw. Thiomorpholin- bzw. Piperazinrest bevorzugt. Der Piperazinrest ist besonders bevorzugt.

35 In der Bedeutung eines von R¹ und R³ gebildeten Alkylenrestes ist der durch Einbeziehung des aromatischen Ringes der allgemeinen Formel I gebildete Indolin- oder 1,2,3,4-Tetrahydrochinolinrest bevorzugt.

Als Salz eines erfindungsgemäßen Nitrosoanilinderivates der allgemeinen Formel I werden insbesondere solche starker Säuren, insbesondere Mineralsäuren, wie Salzsäure, Schwefelsäure, Salpetersäure, Phosphorsäure bevorzugt. Ganz besonders bevorzugt sind Hydrochloride, das sind Salze der Salzsäure.

Bevorzugte Nitrosoverbindungen der allgemeinen Formel I sind:
 N,N'- Bis-(2-hydroxyethyl)-p-nitrosoanilin
 N,N'- Dimethyl -p-nitrosoanilin
 N,N'- Diethyl -p-nitrosoanilin
 45 N-Methyl-N'-(4-nitrosophenyl)-piperazin
 N-(2-hydroxyethyl)-5-nitrosoindolin
 2,4-Dimethoxy-nitrosobenzol
 N,N'-Bis-(2-methoxyethyl)-4-nitrosoanilin
 N-(4-Nitrosophenyl)-morpholin
 50 N-(2,2-diethoxy-ethyl)N'-(4-nitrosophenyl)-piperazin
 p-Nitrosophenol
 3-Methoxy-4-nitrosophenol

Unter den elektronenreichen heteroaromatischen Nitrosoverbindungen, deren aromatisches Ringsystem so elektronenreich ist, daß ein externer + M-Substituent für die Nitroso-/Oxim-Tautomerie und für die Iminbildung entbehrlich ist, sind besonders mit einer Nitrosogruppe substituierte Pyrazolone, Pyrazole und insbesondere nitrososubstituierte Pyrazoloverbindungen, wie sie zum Beispiel in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th ed., Vol A 20, Seite 72 bis 74, beschrieben sind, im erfindungsgemäßen Verfahren geeignet. Bevorzugt sind dabei die 3-Nitrosopyrazolo-Verbindungen der allgemeinen Formel II.



5

Bekannt sind diese Verbindungen zum großen Teil als Vorstufe zur präparativen Synthese der entsprechenden 3-Aminopyrazoloverbindungen aus der Europäischen Patentanmeldung EP-A-0 433 854. In der Formel II bedeutet:

- X-Y NR⁵-CO oder N=CR⁶
- R⁵ Wasserstoff, Alkyl gegebenenfalls substituiert durch Hydroxy, Carboxy, SO₃H, PO₃H₂, Dialkylphosphinyl
- 15 R⁶ Wasserstoff, Alkyl, Alkenyl, Alkoxy, Alkylthio, Aryl, Arylthio, Aralkyl, gegebenenfalls jeweils substituiert durch Hydroxy, Carboxy, SO₃H, PO₃H₂, ein Salz eines dieser Säurereste oder/und Alkoxy carbonyl; oder
 - Amino, das gegebenenfalls durch einen oder zwei gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy- oder/und Alkoxy carbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist wobei, wenn Amino durch 2 Alkylreste substituiert ist, diese Reste auch zu einem Ring geschlossen sein können, der außer durch das N-Atom der Aminogruppe gegebenenfalls auch durch Sauerstoff, Schwefel oder ein weiteres Stickstoffatom unterbrochen sein kann, oder Amino, das gegebenenfalls durch ein oder zwei Acylgruppen, Alkoxy- oder/und Aralkoxy carbonylgruppen, H₂N-CO, Alkyl-, Aralkyl- oder/und Arylcarbamoylgruppen substituiert ist; oder Carboxy, Alkoxy carbonyl, Carboxamido oder Halogen, und
- 20 R⁷ Alkyl, Thioalkyl oder Aralkyl, gegebenenfalls substituiert durch Hydroxy, Carboxy, SO₃H oder PO₃H₂ oder Amino, das gegebenenfalls durch eine oder zwei Alkylgruppen substituiert ist, die wiederum durch Hydroxy, Carboxy, SO₃H, Dialkylphosphinyl oder PO₃H₂ substituiert sein können,
- 25 R⁸ wobei mindestens R⁶ und/oder R⁷ eine Aminogruppe darstellt, und
 - eine Alkyl oder Aralkylgruppe, die gegebenenfalls durch Hydroxy, Carboxy, SO₃H oder PO₃H₂ substituiert sein kann
 - oder wobei
- 30 R⁷ und R⁸ zusammen eine gesättigte oder ungesättigte Kette mit 3 oder 4 Gliedern aus Stickstoffatomen oder aus Kohlenstoffatomen und gegebenenfalls einem oder mehreren Stickstoff- oder Schwefelatomen, wobei Kohlenstoffatome gegebenenfalls substituiert sind durch Alkyl, Alkoxy, Alkylthio, Hydroxy, Aralkyl, Aryl, Carboxy, Carboxamido, Alkoxy carbonyl, Cyano, Halogen, Amino, das gegebenenfalls durch einen oder zwei gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy- oder/und Alkoxy carbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist, und wobei
 - Stickstoffatome, die nicht über eine Doppelbindung gebunden sind, durch Alkyl oder Aralkyl gegebenenfalls durch Hydroxy, SO₃H, PO₃H₂, Carboxy oder Dialkylphosphinyl substituiert, substituiert sind oder zwei benachbarte Kettensubstituenten gegebenenfalls eine Alkylen gruppe bilden, die ihrerseits gegebenenfalls mit Aryl substituiert oder anelliert ist
 - sowie gegebenenfalls entsprechende tautomere Formen und deren Salze
- 35 Hierbei bedeutet "Alkyl" - auch in Alkylthio-, Dialkyl-phosphinyl-, Alkylcarbamoyl- und Aralkylresten - einen geradkettigen oder verzweigten Alkylrest mit 1-6, vorzugsweise 1-4 C-Atomen. Beispiele sind die Methyl-, Ethyl-, Propyl-, iso-Butyl- oder tert.-Butylgruppe.
- 40 Wenn eine Aminogruppe durch 2 Alkylreste substituiert ist, können diese Reste auch so zu einem Ring geschlossen sein, daß sie insgesamt einen durch ein Stickstoffatom unterbrochenen Ring darstellen. Bevorzugt sind hierbei solche Aminogruppen, die einen insgesamt 5- oder 6-gliedrigen Ring darstellen und der seinerseits gegebenenfalls durch Sauerstoff, Schwefel oder Stickstoff unterbrochen ist. Besonders bevorzugt ist der Morpholinorest.
- 45 "Alkoxy" - auch in Alkoxy- und Aralkoxy carbonylresten - steht für einen geradkettigen oder verzweigten Alkoxyrest mit 1 - 6, vorzugsweise 1 - 4 C-Atomen. Beispiele sind die Methoxy-, Ethoxy-, Propyloxy-, iso-Butyloxy- oder tert.-Butyloxygruppe.
- 50 "Aryl" - auch in Arylcarbamoylgruppen - bezeichnet einen Kohlenstoffaromataten- oder Heteroaromatienrest, vorzugsweise einen solchen mit 6 - 10 Ring-Atomen, insbesondere die Phenyl- und die Naphthylgruppe, die zusätzlich noch durch Alkyl, Alkoxy oder/und Halogen substituiert sein
- 55

können. Besonders bevorzugt ist der Phenylrest.

Ein "Aralkyl"-Rest - auch in einer Aralkylcarbamoylgruppe - bedeutet einen Rest, bei dem eine wie vorstehend definierte Alkylgruppe durch einen wie zuvor charakterisierten Arylrest substituiert ist. Bevorzugt ist die Benzylgruppe.

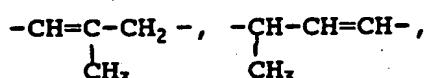
Ein "Aralkoxy"-Rest, beispielsweise in Aralkoxycarbonylgruppen, bezeichnet einen Rest, bei dem eine wie vorstehend definierte Alkoxygruppe durch einen wie zuvor charakterisierten Arylrest substituiert ist. Bevorzugt ist die Benzyloxygruppe.

"Halogen" steht für die Reste Fluor, Chlor, Brom und Jod. Fluor und Chlor sind bevorzugt.

Eine Acylgruppe bezeichnet einen Carbonsäurerest, der Alkyl-, Aralkyl- oder Arylreste enthalten kann. Bevorzugt sind Acetyl-, Phenylacetyl- oder Benzoylreste.

Unter einer Alkylengruppe wird eine geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffkette aus 3 - 5, vorzugsweise 3 oder 4 C-Atomen mit zwei freien Bindungsstellen verstanden.

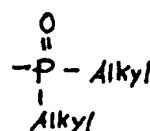
Beispiele sind $-\text{CH}_2\text{-CH=CH-}$,



$-(\text{CH}_2)_4-$ oder $-\text{CH=CH-CH=CH-}$.

Bevorzugt sind der Butadienyrest ($-\text{CH=CH-CH=CH-}$) und der Tetramethylenrest $-(\text{CH}_2)_4-$.

Ein Alkenylrest ist ein geradkettiger oder verzweigter Kohlenwasserstoffrest aus 2-5 C-Atomen mit mindestens einer Doppelbindung. Bevorzugt ist beispielsweise der Vinylrest. Unter einer Dialkylphosphinylgruppe wird der Rest



verstanden, wobei Alkyl die zuvor gegebene Bedeutung hat. Bevorzugt ist der Dimethylphosphinylrest.

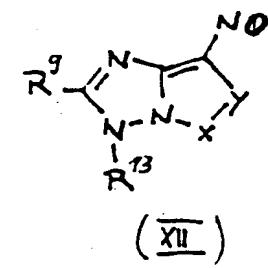
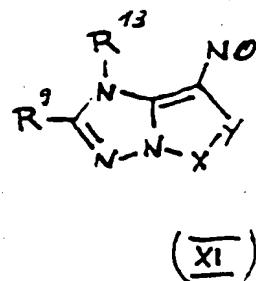
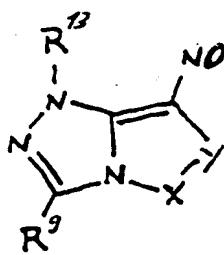
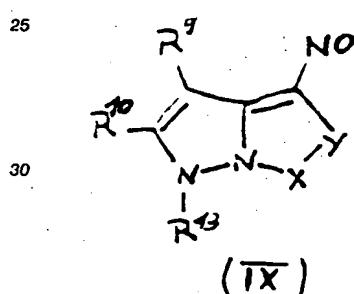
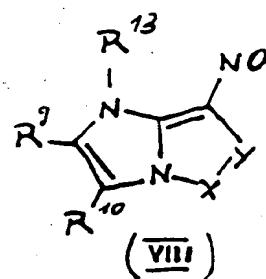
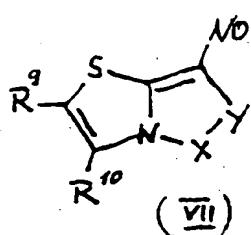
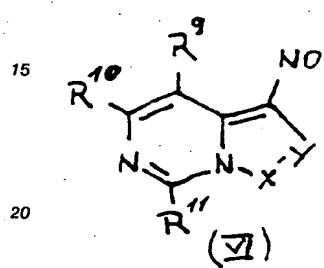
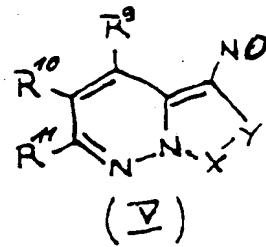
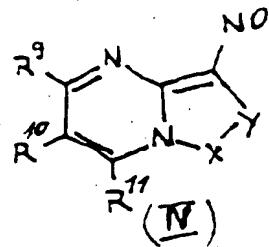
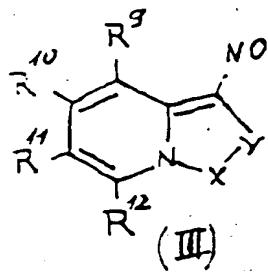
Als Salze von SO_3H , PO_3H_2 und Carboxyresten können Alkali- oder Erdalkalisalze oder Ammoniumsalze eingesetzt werden. Unter Alkalosalzen werden Lithium-, Natrium-, Kalium-, Rubidium- und Cäsiumsalze verstanden, wobei Lithium-, Natrium- und Kaliumsalze, vor allem aber Natrium- und Kaliumsalze bevorzugt sind. Erdalkalisalze sind solche des Berylliums, Magnesiums, Calciums, Strontiums oder Bariums. Bevorzugt sind Magnesium- und Calciumsalze, wobei Calciumsalze besonders bevorzugt sind. Als Ammoniumsalze können solche des unsubstituierten Ammoniumions, NH_4^+ , Verwendung finden. Es ist aber auch möglich, solche Ammoniumsalze einzusetzen, bei denen das Ammoniumion durch 1 - 4 Alkyl-, Aryl- oder Aralkylreste substituiert ist. Für diese Reste gelten die zuvor gegebenen Definitionen, wobei als Alkylrest Methyl, Ethyl und n-Propyl, als Arylrest die Phenylgruppe und als Aralkylrest die Benzylgruppe besonders bevorzugt sind.

Als Carboxamidorest wird der Rest CONH_2 verstanden, aber auch solche Reste, bei denen die Aminogruppe durch ein oder zwei gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy- oder/und Aralkoxycarbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist.

In den erfindungsgemäß eingesetzten Nitroso-Verbindungen der allgemeinen Formel II sind solche Verbindungen bevorzugt, in denen R7 und R8 eine gesättigte oder ungesättigte Kette wie oben beschrieben bildet. Besonders bevorzugt ist dabei, wenn diese Kette ungesättigt ist und Doppelbindungselektronen und freie Stickstoffelektronenpaare der ungesättigten Kette in Konjugation zu der Doppelbindung oder zu dem Brücken-N-Atom der allgemeinen Formel II stehen, so daß ein anellierter aromatischer Ring resultiert.

Gegebenenfalls sind für eine Substanz der allgemeinen Formel II auch tautomere Formen möglich. Diese sollen ebenfalls als von der allgemeinen Formel II umfaßt gelten.

Erfindungsgemäß bevorzugt sind Nitrosoverbindungen der allgemeinen Formeln III bis XII.



sowie gegebenenfalls entsprechende tautomere Formen und deren Salze.

Hierbei hat X-Y die gleiche Bedeutung wie zuvor beschrieben. R⁹, R¹⁰, R¹¹ und R¹², die gleich oder verschieden sind, für Wasserstoff, Hydroxy, Alkyl, Alkoxy, Alkylthio, Aralkyl, Aryl, Carboxy, Alkoxycarbonyl, Carboxamido, Cyano, Amino, das gegebenenfalls durch ein oder zwei gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy- oder/und Alkoxycarbonylreste tragende Alkylerste substituiert ist oder Halogen, wobei zwei benachbarte Reste gegebenenfalls eine Alkylengruppe bilden, die ihrerseits gegebenenfalls mit Aryl substituiert oder anelliert ist und R¹³ Alkyl oder Aralkyl darstellt, das gegebenenfalls durch Hydroxy, Carboxy, SO₃H, PO₃H₂ oder Dialkylphosphinyl substituiert sein kann. Die Definitionen der Reste entsprechen den für die Substanzen der allgemeinen Formel II gegebenen.

Besonders bevorzugt für die erfindungsgemäße Verwendung sind Substanzen der allgemeinen

Formeln III, IV, V, VII, VIII und IX, gegebenenfalls entsprechende tautomere Formen und deren Salze. Ganz besonders bevorzugt sind solche Substanzen, in denen X-Y die Bedeutung $N=CR^6$ hat, wobei R^6 die Bedeutung haben kann wie für die allgemeine Formel II angegeben.

Als hervorragend geeignet für die erfundungsgemäße Verwendung haben sich insbesondere die Verbindungen 3-Nitroso-2-methyl-pyrazolo-[1.5a]-pyridin, 3-Nitroso-pyrazolo-[1.5a]-pyridin und 3-Nitroso-pyrazolo [3.2-c]-s-triazol und deren Salze, insbesondere das Hydrochlorid erwiesen.

Wie vorstehend ausgeführt, werden für das erfundungsgemäße Verfahren aromatische Nitrosoverbindungen mit der zu untersuchenden Probe und der PQQ-abhängigen Dehydrogenase in Kontakt gebracht. In EP-A-0 354 441 und EP-A-0 441 222 wird beschrieben, daß Oxidasen und nicht-NAD-abhängige Dehydrogenasen aromatische Nitrosoverbindungen zu elektronenreichen aromatischen Aminoverbindungen reduzieren, die wiederum mit einem farbgebenden Kupplungsreagenz und einem Oxidationsmittel durch oxidative Kupplung nachgewiesen werden.

Überraschenderweise hat es sich herausgestellt, daß in Anwesenheit eines nichtoxidativen farbbildenden Nachweisreagens für chinoide Iminoverbindungen und einer PQQ-abhängigen Dehydrogenase, eine aromatische Nitrosoverbindung unter Analytoxidation nicht die vollständige, durch eine PQQ-abhängige Dehydrogenase katalysierte enzymatische Reduktion zum elektronenreichen aromatischen Amin durchläuft, sondern daß eine nach einer teilweisen enzymatischen Reduktion entstehende Iminozwischenstufe durch das nicht-oxidative farbbildende Nachweisreagenz abgefangen und nachgewiesen werden kann.

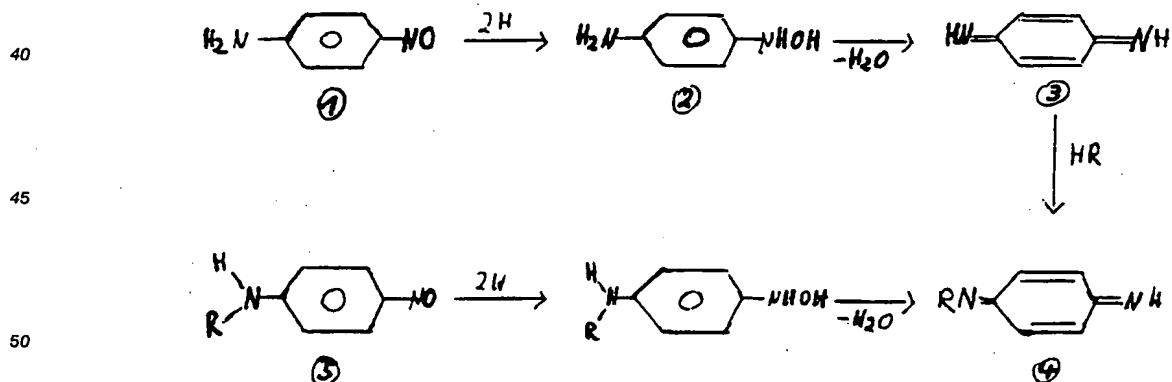
Noch überraschender war, daß wenn bestimmte aromatische Nitrosoverbindungen gewählt werden, die schon einen chromogenen Rest tragen, diese aromatischen Nitrosoverbindungen in Gegenwart einer PQQ-abhängigen Dehydrogenase zwar zur farbigen Iminoverbindung reduziert werden, die enzymatische Weiterreduktion zum aromatischen Amin im wesentlichen aber unterbleibt, so daß auch die farbige Iminoverbindung selbst ohne die Notwendigkeit der Reaktion mit einem farbgebenden Nachweisreagenz als Maß für die Menge des Analyten bestimmt werden kann. Beispiele für entsprechende erfundungsgemäß einsetzbare chromogene Nitrosoverbindungen werden unten gegeben.

Obwohl die Bandbreite der geeigneten elektronenreichen aromatischen Nitrosoverbindungen sehr groß ist, werden sie alle von PQQ-abhängigen Dehydrogenasen als direkte Elektronenakzeptoren akzeptiert. Esentiell scheint lediglich die Nitrosogruppe zu sein, die an einen elektronenreichen aromatischen Rest gebunden ist.

Es wird vermutet, daß die Reaktion nach folgendem Reaktionsschema am Beispiel des Nitrosoanilins dargestellt werden kann:

Schema I

35



Die aromatische Nitrosoverbindung (1) wird unter Oxidation des Analyten zum aromatischen Hydroxylamin (2) reduziert, dieses spaltet spontan Wasser ab, wodurch eine chinoide Iminozwischenstufe (3) entsteht. Bevor diese weiter enzymatisch durch die PQQ-abhängige Dehydrogenase zum aromatischen Amin reduziert wird, wie es aus EP-A-03 54 441 und EP-A-0 441 222 bekannt ist, kann sie beispielsweise durch ein Kupplungsreagenz (HR) abgefangen und als farbiges Kupplungsprodukt (4) kolorimetrisch bestimmt

werden oder sie enthält den chromogenen Rest des Kupplungsproduktes schon in der Ausgangsverbindung (5) und kann so nach enzymatischer Reduktion direkt als farbige Iminoverbindung (4) kolorimetrisch bestimmt werden.

Überraschend ist, daß spezifisch bei der Verwendung von PQQ-abhängigen Dehydrogenasen die Iminozwischenstufe (3) erfindungsgemäß mit einem Nachweisreagenz abgefangen oder direkt nachgewiesen werden kann, ohne daß die weitere aus EP-A-0 354 441 bekannte enzymatische Reduktion zum Amin erfolgt. Denn bei Verwendung von flavinabhängigen Oxidasen, die gemäß EP-A-0 354 441 ebenfalls aromatische Nitrosoverbindungen reduzieren, gelingt ein Nachweis der Iminozwischenstufe nur zu einem geringen Teil, während der größte Teil der Iminozwischenstufe unter Analytoxidation sehr schnell enzymatisch zum aromatischen Amin weiterreduziert wird.

Erfindungsgemäß kann der Nachweis der Iminoverbindung über ihre Eigenfarbe erfolgen.

Erfindungsgemäß kann der Nachweis der chinoiden Iminoverbindung auch mit einem farbgebenden nicht-oxidativen Reagenz erfolgen. Fargebend heißt, daß durch Reaktion des farbbildenden Reagenzes mit der Iminoverbindung eine farbige Substanz erhalten wird, deren Absorptionsmaximum verschieden ist von dem der eingesetzten Nitrosoverbindung und des farbbildenden Reagenzes vor der Reaktion. Unter einem nicht-oxidativen farbgebenden Nachweisreagenz wird verstanden, daß das Nachweisreagenz mit einer nachzuweisenden Verbindung unter Farbbildung reagiert, ohne daß das Nachweisreagenz auf die nachzuweisende Verbindung oxidierend wirkt, (z. B. durch ein im Nachweisreagenz enthaltendes zusätzliches Oxidationsmittel).

Der Nachweis der in dem erfindungsgemäßen Verfahren entstehenden Iminoverbindung kann durch Reaktion eines farbbildenden Kupplungsreagenzes mit der Iminoverbindung erfolgen. Dabei wird eine farbige Substanz erhalten, die die Iminoverbindung als Teilstruktur enthält. Der Nachweis kann aber auch so erfolgen, daß die Iminoverbindung ein Leukofarbstoffmolekül zu einem farbigen Molekül oxidiert.

Möglich ist auch die Kombination beider Nachweisprinzipien, indem ein Kupplungsreagenz mit einem Molekül der nachzuweisenden Iminoverbindung zu einem nicht-farbigen Leukofarbstoffmolekül kuppelt, das durch ein weiteres Molekül der Iminoverbindung zu einem Farbstoff oxidiert wird.

Solch farbgebende Nachweisreagenzen für Iminoverbindungen sind in großer Vielzahl bekannt. Prinzipiell kommen beispielsweise alle Substanzen in Betracht, die mit oxidierten p-Phenylenaminderivaten unter Farbbildung reagieren.

Beispiele für farbgebende Kupplungsnachweisreagenzen sind aromatische Verbindungen, vorzugsweise Phenol- und Naphtholverbindungen, die mit guten Abgangsgruppen, substituiert sind und damit diese Abgangsgruppen leicht und sehr schnell unter Farbbildung durch die nachzuweisende Iminoverbindung substituieren können. Bevorzugte Beispiele sind 1-Naphthol-4-sulfonsäure, 2,4,6-Tribrom-3-hydroxybenzosäure, 2,4-Dichlor-1-naphthol, Tatrazin oder Orange 1.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren sind zum Nachweis der Iminoverbindung auch Nachweisreagenzen einsetzbar, die nicht mit der Iminoverbindung kuppeln, sondern die unter Reduktion der Iminoverbindung zum Amin eine farbige Verbindung bilden. Häufig geschieht dies unter Dimerisierung des Leukofarbstoffes. Geeignete Leukofarbstoffe sind dem Fachmann aus Nachweisverfahren für H_2O_2 oder Peroxidase bekannt. Beispiele für solche Leukofarbstoffe sind 1-Naphthylaminosulfonsäuren, Triarylimidazole (DE-OS 2735690) Diarylimidazole (US-P-4,919,890), Aminocarbazole (DE-OS 2205733, 2338932) Oxazole, Thiazole (EP-A-0 167 973) u.a.

Geeignet sind alle Leukofarbstoffe, die aufgrund ihres Redoxpotentials in der Lage sind, Iminoverbindungen zu reduzieren.

Schließlich lassen sich die Nachweisprinzipien der Kupplung mit einem Kupplungsreagenz und der Oxidation eines Leukofarbstoffes kombinieren, indem als Kupplungskomponente für Iminoverbindungen ein Reagenz eingesetzt wird, das mit der Iminoverbindung eine farblose Leukoverbindung bildet, die erst durch ein zweites Molekül der Iminoverbindung unter dessen Reduktion zum entsprechenden aromatischen Amin zum Farbstoff oxidiert wird. Die gebräuchlichsten, aus der Farbfotografie sehr gut bekannten sogenannten "Kuppler" sind Phenole, Naphthole, Aniline, Naphthylamine sowie deren Derivate und methylenaktive Verbindungen. Eine Übersicht über diese Art von Kupplern gibt T. H. James in "The Theory of the Photographic Process" 3rd ed., Mc Millan, New York, 1966, Chapter 17 auf den Seiten 385 - 390.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird so durchgeführt, daß die zu untersuchende Probe mit einer PQQ-abhängigen Dehydrogenase, einer oder mehreren der vorstehend beschriebenen elektronenreichen aromatischen Nitrosoverbindungen und einem Nachweisreagenz für Iminoverbindungen gleichzeitig kontaktiert wird. Enthält die Probe einen Analyten, der von der PQQ-abhängigen Dehydrogenase oxidiert wird, reagiert die aromatische Nitrosoverbindung unter enzymatischer Reduktion zur entsprechenden Iminoverbindung. Diese reagiert mit dem farbbildenden Nachweisreagenz, so daß die entstehende Farbe mit der Konzentration des Analyten in der Probe korreliert werden kann. Die Farbmessung kann direkt visuell durch

Vergleichsfarben oder photometrisch geschehen.

Ein besonders einfaches Verfahren zum oxidativen Nachweis von Analyten liegt dann vor, wenn die durch Reduktion der aromatischen Nitrosoverbindung entstehende Iminoverbindung selbst farbig ist und nicht erst durch Kupplung mit einem fargebenden Nachweisreagenz oder durch Oxidation eines Leukofarbstoffes nachgewiesen werden muß. Farbige Iminoverbindungen sind an sich wie oben beschrieben dem Fachmann aus der Farbfotographie und aus analytischen Nachweisverfahren bekannt.

Für das erfindungsgemäße Verfahren zum oxidativen Nachweis eines Analyten durch direkte Messung einer farbigen chinoiden Iminoverbindung haben sich Nitrosoanilinverbindungen der Formel XIII als direkte chromogene Elektronenakzeptoren als besonders geeignet erwiesen, die zu einem farbigen Chinondiimin der Formel XIV reduziert werden.

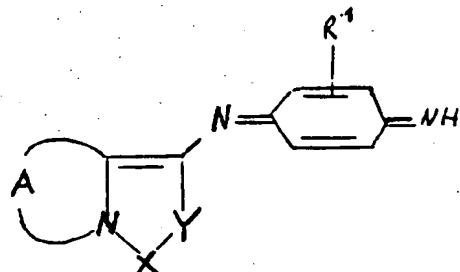
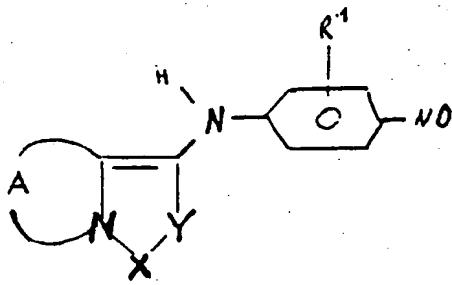
XIII

XIV

15

20

25



R₁ in der allgemeinen Formel XIII bedeutet Wasserstoff, Hydroxy, Halogen, Alkoxy, Alkylthio, Aryloxy oder Arylthio, Alkyl gegebenenfalls substituiert durch Hydroxy, Carboxy, PO₃H₂ oder SO₃H, Amino gegebenenfalls ein- oder mehrfach substituiert durch Alkyl, das wiederum gegebenenfalls durch Hydroxy, PO₃H₂, Dialkylphosphinyl, SO₃H oder Carboxy substituiert sein kann

X-Y bedeutet NR⁵-CO oder N=CR⁶ wobei R⁵ und R⁶ die gleiche Bedeutung hat wie in der allgemeinen Formel II und

A bedeutet eine gesättigte oder ungesättigte Kette aus drei Gliedern mit einem Stickstoff oder Schwefelatom und zwei Kohlenstoffatomen oder zwei Stickstoffatomen und einem Kohlenstoffatom darstellt, wobei Kohlenstoffatome gegebenenfalls substituiert sind durch Alkyl, Alkoxy, Alkylthio, Hydroxy, Aralkyl, Aryl, Carboxy, Carboxamido, Alkoxy carbonyl, Cyano, Halogen, Amino, das gegebenenfalls durch einen oder zwei, gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy-, oder/und Alkoxy carbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist, und wobei Stickstoffatome, die nicht über eine Doppelbindung gebunden sind, durch Wasserstoff, Alkyl, gegebenenfalls substituiert durch SO₃H₂ oder Dialkylphosphinyl, oder durch Aralkyl substituiert sind oder zwei benachbarte Kettenstituenten gegebenenfalls eine Alkylengruppe bilden, die ihrerseits gegebenenfalls mit Aryl substituiert oder anelliert ist, sowie gegebenenfalls entsprechende tautomere Formen und deren Salze

Die Bedeutung der einzelnen Substituenten ist dabei die gleiche wie in den Verbindungen mit der allgemeinen Formel II.

Bevorzugte Reste für R₁ sind dabei Wasserstoff und Alkyl und für X-Y die Gruppe N=CR⁶

Besonders bevorzugt bildet A mit dem benachbarten Heterocyclus einen Imidazol, Triazol- Benzimidazol-, Thiazol- oder Dihydroimidazol-Ring, dessen Kohlenstoffatome die in der allgemeinen Definition von A gegebenen Substituenten tragen können. Ganz besonders bevorzugt ist dabei der Imidazolring.

Besonders bevorzugte Verbindungen sind:

- 50 1) (2,4-Dimethyl-pyrazolo-[1.5a]-imidazol-3-yl)-(4-nitrosophenyl)-amin
- 2) (4-Methyl-pyrazolo-[1.5a]-imidazol-3-yl)-(4-nitrosophenyl)-amin
- 3) (4-(Dimethylphosphinylmethyl)-2-methyl-pyrazolo-[1.5a]-imidazol-3-yl)-(4-nitrosophenylamin)
- 5) (5,6 Dihydro-4-dimethylphosphinylmethyl-2 methylpyrazolo-[1.5a] imidazol-3-yl)-(4-nitrosophenyl)-amin
- 6) (4-(Dimethylphosphinylmethyl)-2-methyl-pyrazolo-[1.5a] imidazol-3-yl)-(4-nitrosophenyl)-amin
- 55 7) (2,6 Dimethyl-4-dimethylphosphinylmethyl-pyrazolo-[3.2-c]-triazol-3-yl)-(4-nitrosophenyl)-amin

Wird das erfindungsgemäße Verfahren so durchgeführt, daß durch Reduktion der aromatischen Nitrosoverbindung direkt eine farbige Chinondiiminverbindung der Formel XVII entsteht, so wird die zu untersuchende Probe mit einer PQQ-abhängigen Dehydrogenase und einer oder mehreren elektronenreichen aromatischen

Nitrosoverbindungen der allgemeinen Formel XVI gleichzeitig kontaktiert. Enthält die Probe einen Analyten, der von PQQ-abhängigen Dehydrogenasen oxidiert wird, reagiert die elektronenreiche aromatische Nitrosoverbindung zum entsprechenden farbigen Chinondiimin. Der zusätzliche Elektronenreichtum des an den chromogenen elektronenreichen Pyrazolring ankondensierten Ringes A bewirkt, daß überraschenderweise die gebildete Chinondiiminverbindung nicht mehr weiter enzymatisch zum entsprechenden Amin reduziert wird, sondern daß die farbige Chinondiiminverbindung direkt in Form einer Lichtabsorptionsmessung gemessen und mit der Konzentration des Analyten in der Probe korreliert werden kann. Um eine schnelle enzymatische Reduktion der chromogenen aromatischen Nitrosoverbindungen zu erzielen, ist es besonders vorteilhaft, wenn diese ausreichend gut löslich sind. Besonders vorteilhaft für das erfundungsgemäße Verfahren beim Einsatz von chromogenen Nitrosoaromaten der Formel XIII ist es, wenn deren Konzentration in Lösung mindestens 10^{-3} mol/l, bevorzugt, mindestens 10^{-2} mol/l, beträgt.

Eine gute Löslichkeit kann insbesondere dadurch erreicht werden, daß die chromogene Nitrosoverbindung mit hydrophilen Gruppen versehen wird.

Entsprechend ausnehmend gut im erfundungsgemäßen Verfahren geeignete chromogene Nitrosoverbindungen sind beispielsweise die vorstehend genannten Verbindungen 3,4 und 7.

Das Verfahren kann in einem sogenannten Naßtest, zum Beispiel einer Küvette oder als sogenannter Trockentest auf einem entsprechenden Reagenzträger durchgeführt werden, wobei die notwendigen Testreagenzien auf einem Testträger insbesondere einem saugfähigen oder quellbaren Material vorliegen. Solche Testträger sind zum Beispiel aus DE-A-3 247 608, EP-A-0 262 445 oder EP-A-0 256 806 bekannt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Mittel zur kolorimetrischen Bestimmung eines Analyten durch enzymatische Oxidation, wie es in den Ansprüchen gekennzeichnet ist. Ein solches Mittel enthält neben der für enzymatische Oxidation des zu bestimmenden Analyten notwendigen PQQ-abhängigen Dehydrogenase und neben mindestens einer aromatischen Nitrosoverbindung als direktem Elektronenakzeptor, der die bei der enzymatischen Oxidation des Analyten freiwerdenden Elektronen von dem PQQ/Dehydrogenase-System übernimmt, weiterhin zusätzlich ein farberzeugendes nichtoxidatives Nachweisreagenz für Iminoverbindungen.

Als PQQ-Dehydrogenasen, aromatische Nitrosoverbindungen und farbbildende Nachweisreagenzien für chinoide Iminoverbindungen werden die vorstehend für das erfundungsgemäße Verfahren beschriebenen Stoffe eingesetzt. Werden in den erfundungsgemäßen Verfahren elektronenreiche aromatische Nitrosoverbindungen der Formel XIII eingesetzt, die einen am Anilinstickstoff gebundenen chromogenen Rest schon enthalten, so enthält das Mittel vorteilhafterweise kein farberzeugendes Nachweisreagenz für Iminoverbindungen, da das bei Reduktion entstehende Chinondiimin der Formel XIV schon farbig ist.

Zur Einhaltung eines für die Durchführung des Verfahrens geeigneten pH-Wertes, der sich insbesondere nach den einzusetzenden Enzymen und nach dem Nachweisreagenz für die Iminoverbindung richtet, enthält das erfundungsgemäße Mittel ein Puffersystem. Vorteilhafterweise enthält das Mittel ein Puffersystem, das in der Testlösung einen pH-Wert zwischen 4 - 9 einstellt. Insbesondere vorteilhaft ist ein leicht saurer pH-Wert zwischen 5 und 6,5.

Das erfundungsgemäße Mittel kann in Form einer Lösung oder auf einem saugfähigen oder quellbaren Träger aufgezogen vorliegen. In Form einer Lösung enthält das Mittel vorzugsweise sämtliche für das erfundungsgemäße Verfahren benötigte Reagenzien. Als Lösungsmittel kommen bevorzugt Wasser, aber auch Mischungen mit wasserlöslichen organischen Lösungsmittel, wie zum Beispiel Methanol, Ethanol, Aceton oder Dimethylformamid in Frage. Aus Haltbarkeitsgründen kann es vorteilhaft sein, die für den Test benötigten Reagenzien auf zwei oder mehreren Lösungen zu verteilen, die erst bei der eigentlichen Untersuchung vermischt werden. Zweckmäßigerweise ist aber darauf zu achten, daß die aromatische Nitrosoverbindung und das Nachweisreagenz für Iminoverbindungen vor Testbeginn in einer Lösung vorliegen. Die Konzentration der eingesetzten aromatischen Nitrosoverbindungen richtet sich nach der Konzentration des zu messenden Analyten.

Typische Konzentrationen für die im erfundungsgemäßen Verfahren zu messenden Analyte sind 10^{-6} - 10^{-2} mol/l, insbesondere 10^{-5} - 10^{-3} mol/l. Entsprechend sind typische Konzentrationen der eingesetzten Nitrosoverbindungen 10^{-4} - 10^{-1} mol/l. Um eine ausreichend schnelle enzymatische Reduktion zu erzielen sind Konzentrationen der Nitrosoverbindungen, insbesondere der chromogenen Nitrosoverbindungen der Formel XIV, von über 10^{-3} mol/l besonders vorteilhaft. Die Konzentration der eingesetzten PQQ-abhängigen Dehydrogenase richtet sich nach deren Aktivität und der Konzentration des Analyten. Typische Werte für Enzymkonzentrationen sind 1mU/ml - 1U/ml bei Küvettentests.

Nachweisreagenzien für Iminoverbindungen werden mindestens im stöchiometrischen Verhältnis zu den eingesetzten Nitrosoverbindungen eingesetzt, bevorzugt in einem 1,5 - 2-fachen Überschuß.

Das erfundungsgemäße Mittel kann auch in Form eines Teststreifens vorliegen. Solche Teststreifen sind in verschiedensten Ausführungsarten bekannt, zum Beispiel aus EP-A-0 016 387, DE-A-3247608, EP-A-0

262 445 oder EP-A-0 256 806. In einem Teststreifen liegen die zur Durchführung des Bestimmungsverfahrens benötigten Reagenzien auf festen Trägerschichten vor. Als Trägerschichten kommen insbesondere saugfähige und/oder quellbare Materialien in Frage, die von der zu untersuchenden Probenflüssigkeit benetzt werden. Beispiele sind Gelatine, Cellulose oder Kunstfaservliese. In oder auf diesen Trägermaterialien liegen die Reagenzien in fester Form vor. Bei Aufgabe der Probenflüssigkeit auf den Teststreifen oder Eintauchen des Teststreifens in die Probenflüssigkeit, bildet sich in den Streifen ein flüssiges Milieu aus, innerhalb dessen die Nachweisreaktion abläuft. Die durch die Reaktion verursachte Farbbildung kann visuell oder photometrisch, zum Beispiel reflektionsphotometrisch ausgewertet werden.

Die bevorzugten Konzentrationen der einzelnen Reagenzien auf Teststreifen betragen:
 10 Analyt typischerweise 10-4 bis 10-1 M
 Nitrosoverbindung 10-3 bis 1M
 nichtoxidatives Nachweisreagenz 10-3 bis 1M
 Enzym 0,1 bis 100 U pro Testfeld

Die vorliegende Erfindung bietet den Vorteil, daß keine unspezifischen Reduktionskatalysatoren wie Diaphorase oder Methylphenazinium-methosulfat zur Reduktion eines Elektronenakzeptors notwendig sind, sondern daß dessen Reduktion direkt über ein spezifisches Analyt/Enzymsystem erfolgt. Störende Nebenreaktionen können so vermieden werden. Durch den Einsatz von Nitrosoverbindungen als Elektronenakzeptoren tritt keine Limitierung des Elektronenakzeptors beispielsweise durch zu langsame Diffusion mehr auf, wie dies bei Sauerstoff als Elektronenakzeptor der Fall ist. Pro Äquivalent der nachzuweisenden Iminozwischenstufe wird nur ein Äquivalent des Analyten oxidiert. Dies bewirkt eine hohe Empfindlichkeit des Analytnachweises. Ferner werden keine Oxidationsmittel für die Reaktion mit einem farberzeugenden Reagenz benötigt. Deshalb kann auch die gesamte Nachweisreaktion ohne Störung in einer Stufe und in einer gemeinsamen Lösung durchgeführt werden. Die große Bandbreite der einzusetzenden farbbildenden Nachweisreagenzen, unter anderem solche, die aus der Farbfotografie bekannt sind, erlaubt eine nahezu freie Auswahl der Wellenlänge bei der die Messung durchgeführt werden soll und des Extinktionskoeffizienten der die Empfindlichkeit der Messung bestimmt.

Ganz besonders einfach gestaltet sich das erfundungsgemäße Verfahren, wenn direkt eine farbige Iminoverbindung gebildet und eine Reaktion mit einem farbgebenden Reagenz unnötig wird.

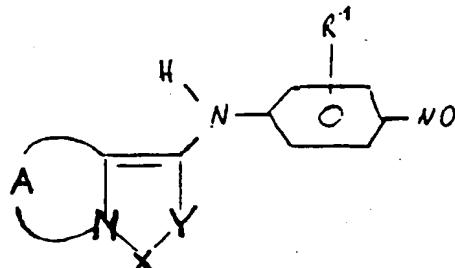
Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind neue chromogene Nitrosoanilinverbindungen der Formel XIII

XIII

35

40

45



wobei

R¹

Wasserstoff, Hydroxy, Halogen, Alkoxy oder Alkylthio, Aryloxy oder Arylthio, Alkyl gegebenenfalls substituiert durch Hydroxy, Carboxy, PO₃H₂, Alkyl, Dialkylphosphinyl oder SO₃H, Amino gegebenenfalls ein- oder mehrfach substituiert durch Alkyl, das wiederrum gegebenenfalls durch Hydroxy, PO₃H₂, SO₃H oder Carboxy substituiert sein kann, bedeutet, und NR⁵ -CO oder N = CR⁶ bedeutet

X-Y NR⁵-CO oder N = CR⁶ bedeutet, wobei

R⁵ Wasserstoff, Alkyl gegebenenfalls substituiert durch Hydroxy, Carboxy, SO₃H, PO₃H₂, Dialkylphosphinyl und

R⁶ Wasserstoff, Alkyl gegebenenfalls jeweils substituiert durch Hydroxy, Dialkylphosphinyl, Carboxy, SO₃H, PO₃H₂, ein Salz eines dieser Säurereste oder/und Alkoxy carbonyl; oder Amino, das gegebenenfalls durch einen oder zwei gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy-

oder/und Alkoxycarbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist, wobei, wenn Amino durch 2 Alkylreste substituiert ist, diese Reste auch zu einem Ring geschlossen sein können, der außer durch das N-Atom der Aminogruppe gegebenenfalls auch durch Sauerstoff, Schwefel oder ein weiteres Stickstoffatom unterbrochen sein kann, oder Amino, das gegebenenfalls durch ein oder zwei Acylgruppen, Alkoxy- oder/und

- 5 Aralkoxycarbonylgruppen, H₂N-CO, Alkyl-, Aralkyl- oder/und Arylcarbamoylgruppen substituiert ist; oder Wasserstoff, Carboxy, Alkoxycarbonyl, Carboxamido oder Halogen und
- A eine gesättigte oder ungesättigte Kette aus drei Gliedern mit einem Stickstoff oder Schwefelatom und zwei Kohlenstoffatomen oder zwei Stickstoffatomen und einem Kohlenstoffatom darstellt, wobei Kohlenstoffatome gegebenenfalls substituiert sind durch Alkyl, Alkoxy, Alkylthio, Hydroxy, Aralkyl, Aryl, Carboxy,
- 10 Carboxamido, Alkoxycarbonyl, Cyano, Halogen, Amino, das gegebenenfalls durch einen oder zwei, gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy-, oder/und Alkoxycarbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist, und wobei Stickstoffatome, die nicht über eine Doppelbindung gebunden sind, durch Wasserstoff, Alkyl, gegebenenfalls substituiert durch Hydroxy, SO₃H, Carboxy, PO₃H₂ oder Dialkylphosphinyl, oder durch Aralkyl substituiert sind oder zwei benachbarte Kettensubstituenten gegebenenfalls eine Alkylengruppe bilden, die ihrerseits gegebenenfalls mit Aryl substituiert oder anelliert ist,
- 15 sowie gegebenenfalls entsprechende tautomere Formen und deren Salze

Die Bedeutung der einzelnen Substituenten ist dabei die gleiche wie in der Verbindung mit der allgemeinen Formel II.

- Bevorzugte Reste R₁ sind Wasserstoff und unsubstituiertes oder substituiertes Alkyl. X-y bildet bevorzugt die Gruppe N=CR⁶ wobei R⁶ bevorzugt Wasserstoff oder unsubstituiertes oder substituiertes Alkyl darstellt.

Bevorzugt bildet A mit dem benachbarten Heterocyclus einen Imidazol-, Triazol-, Benzimidazol-, Thiazol- oder Dihydroimidazol-Ring, in denen die Bedeutung der Ring-Substituenten denen der allgemeinen Formel III entspricht.

- 25 Ganz besonders bevorzugt bildet A einen Imidazolring. Besonders bevorzugte Verbindungen sind:
 - 1) (2,4-Dimethyl-pyrazolo-[1.5a]-imidazol-3-yl)-(4-nitrosophenyl)-amin
 - 2) (4-Methyl-pyrazolo-[1.5a]-imidazol-3-yl)-(4-nitrosophenyl)-amin
 - 3) (4-(Dimethylphosphinylmethyl)-2-methyl-pyrazolo-[1.5a]-imidazol-3-yl)-(4-nitrosophenylamin)
 - 5) (5,6 Dihydro-4-dimethylphosphinylmethyl-2 methylpyrazolo-[1.5a]-imidazol-3-yl)-(4-nitrosophenyl)-amin
 - 30 6) (4-(Dimethylphosphinylmethyl)-2-methyl-pyrazolo-[1.5a] imidazol-3-yl-(4-nitrosophenyl)-amin
 - 7) (2,6 Dimethyl-4-dimethylphosphinylmethyl-pyrazolo[3.2-c]-s-triazol-3-yl)-(4-nitrosophenyl)-amin

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel XIII erfolgt nach an sich bekannten Methoden, wie sie von J.T. Hays et al. im J. Org. Chem. 32, 158 (1967) beschrieben wurden. Dazu werden Ether, bevorzugt Methylether, von p-Nitrosophenolderivaten unter Protonenkatalyse mit entsprechenden 3-Amino-heterocyclen umgesetzt. Unter Substitution der Methoxygruppe entstehen sekundäre Amine der Formel XIII.

Die verwendeten Hetarylamine sind entweder in der Literatur beschrieben oder können analog den bekannten Verfahren hergestellt werden. Insbesondere sind Aminoverbindungen, die als Grundbaustein Pyrazolo-Heterocyclen enthalten, in EP-A-0 433 854 beschrieben.

- 40 Die als Zwischenprodukte benötigten Aminoverbindungen liegen in der Regel aus Haltbarkeitsgründen als Salze von starken Säuren, z.B. Mineralsäuren vor. Zur Umsetzung mit p-Nitrosoanisolen werden bevorzugt die freien Basen der Aminoverbindungen eingesetzt, die man nach üblichen Methoden z.B. durch Auflösen der Salze in Wasser, Zugabe von Base bis zu einem pH 8-10 und Extraktion der freien Base mit einem organischen Lösungsmittel beispielsweise Essigester oder Methylchlorid erhält. Alternativ dazu kann man, insbesondere bei schwer extrahierbaren Aminoverbindungen folgendermaßen vorgehen: Man löst die Aminoverbindung in Methanol, gibt dann eine Base z.B. NaHCO₃-Lösung, Triethylamin usw. zu, bis der pH-Wert der Methanolösung auf einem nassen pH Papier etwa den Wert 5-6 erreicht hat. Anschließend setzt man den zweiten Reaktionspartner, das p-Nitrosoanisol, zu.

50 Beispiel 1

Glucose-Bestimmung mit PQQ-abhängiger Glucose-Dye-Oxidoreductase und 1-Naphthol-Sulfonsäure als Kupplungsreagenz

In einer Küvette wurden gemischt:

EP 0 620 283 A1

5	Citratpuffer/Pyrophosphatpuffer (50mM) pH 7,5 N,N- Bis (2-hydroxyethyl)-4-nitrosoanilin (5mM in Puffer) 1-Naphthol-4-Sulfonsäure (10 mM in H ₂ O) als Kupplungsreagenz Probelösung (0-40 mM Glucose)	0,38 ml 0,40 ml 0,20 ml 0,01 ml
---	--	--

Der Test wurde durch Zugabe von 0,01 ml Enzimlösung (Glucose-Dye-Oxidoreduktase, EC 1.1.99.17, 900 U/mg, 800 U/ml) gestartet und die Extinktionsänderung bei 606 nm gemessen. Konstante Extinktionswerte wurden nach maximal 5 Minuten erreicht (Figur 1).

10

Beispiel 2

Glucosenachweis mit PQQ-abhängiger Glucose-Dye-Oxidoreduktase und 2,4,6-Tribrom-3-hydroxybenzoësäure als Nachweisreagenz.

15

Meßansatz (Endkonzentrationen)

20

100 mM	Citratpuffer pH 5,8
10 mM	2,4,6-Tribrom-3-hydroxybenzoësäure
1 mM	N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-4-nitrosoanilin
10 U/ml	Glucose-Dye-Oxidoreduktase
0,1 M	Natriumnitrat
100-500 mM	Glucose

25

Mit zunehmender Glukosekonzentration wird eine zunehmende Bildung eines grünen Farbstoffes beobachtet (max.= 700 nm, Figur 2).

30

Beispiel 3

In gleicher Weise können die in Tabelle 1 aufgeführten weiteren Kupplungsreagenzien für Imine eingesetzt werden. Tabelle 1 gibt die nach der Kupplung des N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-p-chinondiimins mit den aufgeführten Kupplern erhaltenen Absorptionsmaxima wieder.

35

40

45

50

55

Tabelle 1

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Kuppler	Farbe	$\lambda_{\text{max}}:\text{nm}$	Bemerkungen
N-Phenyl-N-methyl-amino-methyloxosonsäure	blaugrün	740	
N-Methylanthranilsäure	grün	720	scharfe Bande
Julolidin	türkis	710	breite Bande
2,4,6-Tribrom-3-hydroxybenzoësäure	grün	705	
1-Naphthol-2-sulfonsäure	blau	640	
3,4,5-Trimethoxybenzoësäure	blaugrün	610	
3-Methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-on	violett	565	
Acetessigsäureanilid	orange	455	breite Bande
2,4-Dichlor-1-naphthol	blau	600 (670 sh)	bleicht langsam
4-Brom-2,6-dimethyl-phenol	blau	600	stabil
3-Phenyl-5-isoxazolon	flieder	565	
Benzoylacetonitril	rot (violett)	515	intensiv, brillant
Cyanacetanilid	orange-rot	490	
	blau	595	brillante Farbe
	blaugrau	590	verblaßt zu gelb
	blaugrau	605	verblaßt zu grau-rötlich
	violett	550	schwache Färbung
Tartrazin	grün	610	Mischfarbe
Orange 1	blau	ca. 650	
	blau	ca. 600	

55 Beispiel 4

Analog Beispiel 1 werden verschiedene in Tabelle 2 aufgeführte elektronenreiche aromatische Nitrosoverbindungen eingesetzt. Tabelle 2 gibt die nach Kupplung mit 1-Naphthol-2-Sulfonsäure oder 1-Naphthol-

4-Sulfonsäure erhaltenen Farben bzw. Absorptionsmaxima an.

Tabelle 2

5

	Nitrosoverbindung	Kuppler	Farbe	$\lambda_{\text{max}} \text{ nm}$
10		1-Naphthol-2-sulfon-säure	violett	530
15		1-Naphthol-2-sulfon-säure	purpur	530
20		1-Naphthol-4-sulfon-säure	violett bis blau	610
25		1-Naphthol-4-sulfon-säure	"	610
30		1-Naphthol-4-sulfon-säure	"	640
35		1-Naphthol-4-sulfon-säure	"	550
40		1-Naphthol-4-sulfon-säure	"	550
45		1-Naphthol-4-sulfon-säure	"	595
50		1-Naphthol-4-sulfon-säure	"	605
55		1-Naphthol-4-sulfon-säure	"	520
		1-Naphthol-4-sulfon-säure	"	550
		1-Naphthol-4-sulfon-säure	"	540

55

Beispiel 5

Vergleich der Glukosebestimmung mittels Nachweis von Iminoverbindungen durch reduktive Kupplungen zwischen PQQ-abhängiger Glucose-Dye-Oxidoreduktase und Glucose-Oxidase.

5 In einer Küvette werden vorgelegt:

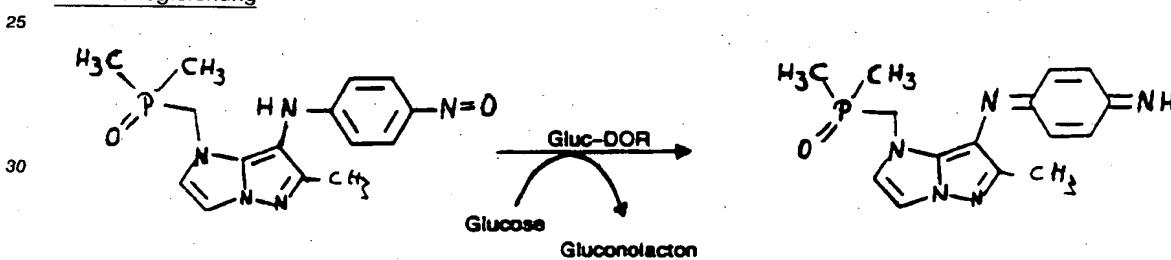
10	100 mM Phosphatpuffer pH 7,5 1 mM N,N-Bis-(2 hydroxyethyl)-4-nitrosoanilin 10 mM 1-Naphthol-4-Sulfonsäure 100 U/ml Glucose-Dye-Oxidoreductase
----	--

Durch Zugabe von Glucose (0-60 mM) erhält man entsprechende Mengen an Farbe (Figur 3).

15 Wird die Glucose-Dye-Oxidoreductase durch die gleiche Menge Glucose-Oxidase ersetzt, erhält man hingegen nur eine um den Faktor 8 geringere Farbausbeute, da ein Großteil der gebildeten Chinondiimin-Zwischenstufe von Glucoseoxidase unter Verbrauch von Glucose zum Phenylendiamin weiterreduziert wird (Figur 4).

Beispiel 6

20 Glukosebestimmung mit PQQ-abhängiger Glucose-Dye-Oxidoreductase mittels reduktiver Bildung von farbigen Iminoverbindungen.

Reaktionsgleichung

40

Die Spektren von (3) und (3a) zeigen Figur 5.

Meßansatz (Endkonzentration)

45

50	200 mM Citratpuffer pH 6 1 mM p-Nitrosoanilin (Nr. 3 aus Tabelle 3) 1 mM CaCl ₂ 20 U/ml Mutarotase 10 U/ml Glucose-Dye-Oxidoreductase
----	---

Nach Zugabe verschiedener Glucosemengen zwischen 0 und 50 µM Endkonzentration wurden 5 min. später die Extinktionsänderungen gemessen (Figur 6)

55 Analog werden die Verbindungen aus Tabelle 3 eingesetzt. Tabelle 3 gibt die Absorptionsmaxima der eingesetzten Nitrosoverbindungen und der entstehenden farbigen Chinondiime an.

Tabelle 3

Nr.	Struktur	Löslichkeit in Wasser	λ_{\max} [nm] des p-Nitroanilins	λ_{\max} [nm] des Chinondiimins
1		~ 1 mM	420	615
2		~ 1 mM	430	590
3		~ 10 mM	430	620
4		~ 10 mM	430	620
5		~ 0,1 mM	420	630
6		10 mM	420	610
7		10 mM	420	617
8		0,2 mM	430	590

Beispiel 7

Bestimmung der Enzymaktivität einer PQQ-abhängigen Glucose-Dye-Oxidoreductasemittels reduktiver Bildung einer farbigen Iminoverbindung aus einer aromatischen Nitrosoverbindung.

EP 0 620 283 A1

Die im Beispiel 6 beschriebene Reaktion kann auch zur Messung der Enzymaktivität einer PQQ-abhängigen Dehydrogenase benutzt werden.

Meßansatz (Endkonzentration)

5

10

200 mM	Citratpuffer pH 5,8
1 mM	p-Nitrosoanilin (3) aus Beispiel 6
1mM	CaCl ₂
30 mM	Glucose

Die kinetische Messung wurde mit 0-1 mU Glucose-Dye-Oxidoreduktase gestartet und die Farbänderung zeitlich gemessen (Figur 7)

15

Beispiel 8

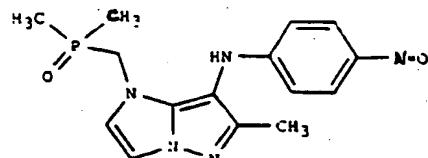
(4-(Dimethylphosphinylmethyl)-2-methyl-pyrazolo-[1.5a]-imidazol-3-yl)-(4-nitrosophenyl)-amin (3)

20 13.7 g 3-Amino-2-methyl-4-(dimethylphosphinylmethyl)-pyrazolo-[1.5a]-imidazol Dihydrochlorid werden in 350 ml Methanol gelöst. Die Lösung wird auf ca. 5 °C abgekühlt und mit konz. wässriger Natriumbikarbonatlösung versetzt, bis auf einem nassen pH-Papier ein pH-Wert von ca. 6 angezeigt wird. Dazu tropft man innerhalb von 30 min eine Lösung von 7.8 g p-Nitrosoanisol in 35 ml Methanol zu. Man röhrt die Mischung 4 Stunden bei Raumtemperatur und hält den pH-Wert durch Zugabe von weiterer NaHCO₃-Lösung auf 6.

25 Das Reaktionsgemisch wird filtriert, mit ca. 150 ml Kieselgel vermischt und zur Trockene eingedampft. Das Kieselgel wird auf eine Kieselgelsäule gepackt und das Produkt durch Eluieren mit Toluol/Methanol 2 : 1 isoliert. Man erhält 10.3 g einer schwarzbraunen Masse, die erneut über Kieselgel mit Methylchlorid/Methanol 12 : 1 chromatographiert wird. Man erhält 4.9 g der Titelverbindung mit dem Fp. 204 ° (unter Zersetzung).

30 R_f (Kieselgel) Toluol/Methanol 2 : 1 = 0.3
CH₂Cl₂/Methanol 12 : 1 = 0.21

35



40

3

45

Herstellung des Ausgangsproduktes

a) 4-Dimethylphosphinylmethyl-2-methyl-pyrazolo-[1.5a]-imidazol
37 g 2-Methyl-pyrazolo-[1.5a]-imidazol (J. Het. Chem. 10, 441 (1973)) werden in 370 ml trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 54.2 g Chlormethylidimethylphosphanoxid und 119 g Kaliumcarbonat versetzt. Die Mischung wird 10 Std. bei 115 ° (Badtemp.) gerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wird an Kieselgel chromatographiert (Laufmittel Essigester/Methanol 2 : 1). Man erhält insgesamt 36.6 g der Titelverbindung als Mischung von braunen Kristallen und einem braunen Öl. DC (Kieselgel, Essigester/Methanol 2 : 1) R_f = 0.2

b) 3-Amino-4-dimethylphosphinylmethyl-2-methyl-pyrazolo-[1.5a]-imidazol x 2 HCl
18 g der oben erhaltenen Verbindung werden in 25 ml konz. Salzsäure und 50 ml Wasser gelöst. Dazu tropft man bei 0 ° eine Lösung von 6.2 g Natriumnitrit in 25 ml Wasser. Nach 30 min bei 0 ° macht man die Lösung durch Zugabe von Natriumbikarbonatlösung leicht alkalisch und gibt dann portionsweise

21.4 g Natriumdithionit zu. Man röhrt das Gemisch noch 30 min und versetzt es mit einer Lösung von 17 g Di-tert.-butyldicarbonat in 100 ml Dioxan. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, das Dioxan abdestilliert und der Rückstand mehrfach mit n-Butanol/Essigester 3 : 1 extrahiert. Der nach dem Trocknen und Eindampfen der organischen Phase verbleibende Rückstand wird in 320 ml mit HCl gesättigtem Methanol gelöst. Man röhrt noch 2 Stunden, kühlt im Eisbad ab und filtriert die ausgefallenen Kristalle ab. Es ergeben sich insgesamt 18.1 g der Titelverbindung. DC (Kieselgel, Toluol/Methanol 3 : 1)

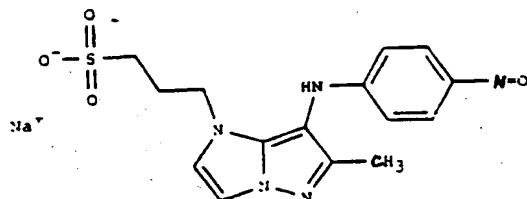
$R_f = 0.1$.

10 Beispiel 9

(4-Nitrosophenyl)-2-methyl-(4-sulfopropyl-pyrazolo-[1.5a]-imidazol-3-yl)-amin (4)

Analog Beispiel 7 setzt man 3-Amino-4-sulfopropyl-pyrazolo-[1.5a]-imidazol mit p-Nitrosoanisol in Methanol um. Die Reaktionsmischung wird filtriert und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wird über Kieselgel mit Toluol/Methanol 2 : 1 chromatographiert. Das Produkt wird dann zur weiteren Reinigung auf eine Säule mit dem Adsorberharz HP 20SS (Fa. Mitsubishi) gegeben und mit einem Stufengradienten von Methanol/Wasser 1 : 9 bis 2 : 8 eluiert. Man vereinigt die produkthaltigen Fraktionen, engt ein, nimmt in wenig Ethanol auf und fällt das Produkt durch Zugabe von Ether aus. Man erhält das Titelprodukt in Form eines braunen Pulvers.

DC (Kieselgel, Ethanol: $R_f = 0.6$, Isopropanol/Essigsäurebutylester/Wasser 5 : 3 : 2: $R_f = 0.48$)



4

35

Herstellung des Ausgangsproduktes

a) 2-Methyl-4-sulfopropyl-pyrazolo-[1.5a]-imidazol

2-Methyl-pyrazolo-[1.5a]-imidazol wird mit Phenyl diazoniumsalz, das man in üblicher Weise durch Diazotieren von Anilin erhält, bei pH 2-5 umgesetzt. Das erhaltene 2-Methyl-3-phenylazo-pyrazolo-[1.5a]-imidazol (5.6 g) wird in 60 ml Dimethylformamid gelöst, mit 3.4 g Propansulton und 7 g Kaliumcarbonat versetzt. Man röhrt das Gemisch 6 Std. bei 110 °C, gibt erneut 5 g Propansulton und 7 g Kaliumcarbonat hinzu und röhrt weitere 8 Stunden bei 110 °C. Nach dem Abkühlen wird filtriert und der Rückstand zweimal gut mit Methanol gewaschen. Die Lösung wird eingeengt und der Rückstand chromatographisch an Kieselgel getrennt (Laufmittel Essigester/Methanol/Wasser 75 : 15 : 10).

Ausbeute: 5.3 g gelbbraune Kristalle

DC (Kieselgel, Essigester/Methanol/Wasser 75 : 15 : 10)

$R_f = 0.3$

b) 3-Amino-2-methyl-4-sulfopropyl-pyrazolo-[1.5a]-imidazol

50 4.3 g der oben erhaltenen Azoverbindung werden in 40 ml Eisessig gelöst und innerhalb 1 Stunde portionsweise mit 4 g Zinkpulver versetzt. Man röhrt das Gemisch noch 30 min, saugt ab und dampft ein. Der Rückstand wird mit 30 ml Essigester verrieben, abgesaugt und das Filtrat verworfen. Man erhält 10.2 g eines graubraunen Pulvers, das zur Weiterverarbeitung rein genug ist.

DC (Kieselgel, Essigester/Aceton/Eisessig/Wasser 5 : 2 : 2 : 1)

55 $R_f = 0.14$

Beispiel 10

Analog zu Beispiel 8 oder 9 wurden die Verbindungen aus Tabelle 4 hergestellt. Die Synthese der Amino-Ausgangsverbindungen erfolgt auf folgende Weise:

5

a)

Herstellung der Ausgangsverbindung zu 5 in Tabelle 4:

10

3-Amino-5,6-dihydro-,4-dimethylphosphinylmethyl-2-methyl-pyrazolo-[1.5a]-imidazol

15

3.9 g 2-Methyl-pyrazolo-[1.5a]-imidazolin, 2.7 g Natriumacetat und 7.4 g p-Methoxybenzoldiazonium-tetrafluoroborat werden in 40 ml Eisessig gelöst und die Lösung 1 Stunde auf 40 - 50 ° erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird eingedampft, der Rückstand in NaHCO₃-Lösung und Essigester aufgenommen. Man extrahiert mit Essigester, trocknet und dampft ein. Der Rückstand wird durch Chromatographie über Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Essigester/Ligroin 1 : 1 - 2 : 1; Essigester; Essigester/Methanol 95 : 5). Man erhält 4.12 g der entsprechenden 3-Azoverbindung (DC: Kieselgel, Essigester/Methanol 95 : 5; R_f = 0.5), die mit Chlormethylidimethylphosphanoxid am Stickstoff des Imidazolinringes alkyliert wird. Die Überführung in die 3-Aminoverbindung erfolgt durch Reduktion der Azogruppe analog Beispiel 8b.

20

Zur Isolierung und Reinigung wird die rohe Aminoverbindung in wenig Wasser gelöst, mit festem Natriumbicarbonat versetzt und eine Lösung der dreifachen molaren Menge an Diter.-butyldicarbonat in Dioxan zugegeben. Man röhrt das Gemisch über Nacht, dampft ein, extrahiert zunächst mit Ether, um Nebenprodukte zu entfernen und dann 5mal mit Methylenchlorid, um das Produkt zu isolieren. Man erhält die kristalline t-Butoxycarbonylverbindung (DC: Essigester/Aceton/Eisessig/Wasser 50 : 25 : 12 : 5 : 12 : 5, R_f = 0.5), die zur Abspaltung der tert. Butoxycarbonylgruppe in 50 ml methanolischer Salzsäure gelöst wird. Nach 1 Stunde bei Raumtemperatur engt man auf die Hälfte ein und fällt das Produkt mit Ether aus. Man erhält die Titelverbindung als Hydrochlorid. DC: n-Butanol/Eisessig/Wasser 2 : 1 : 1 R_f = 0.3

30

b)

Herstellung der Ausgangsverbindung zu 6 in Tabelle 4:

35

3-Amino-4-dimethylphosphinylmethyl-2-methyl-pyrazolo-[1.5a]-benzimidazol

40

Die Titelverbindung wird analog Beispiel 10 durch Umsetzung von 2-Methyl-pyrazolo-[1.5a]-benzimidazol (J. prakt. Chem. 326, 829 (1984)) mit Phenylazoniumsalz, N-Alkylierung mit Chlormethyl-dimethylphosphanoxid und Reduktion der Azogruppe mit Zink in Eisessig durchgeführt. Man erhält die Titelverbindung als Trihydrochlorid-Dihydrat vom Fp. 192 (Zersetzung)
DC: Kieselgel, Isopropanol/Essigsäurebutylester/Wasser 50 : 30 : 20)

R_f = 0.38

45

c)

Herstellung der Ausgangsverbindung zu 7 in Tabelle 4:

50

3-Amino-2,6-dimethyl-4-dimethylphosphinyl-pyrazolo-[3.2c]-s-triazol

55

6 g 2,6-Dimethyl-pyrazolo-[3.2c]-s-triazol werden in 65 ml Dimethylformamid gelöst und die Lösung mit 3.9 g Chlormethyl-dimethylphosphanoxid und 8 g Kaliumcarbonat versetzt. Man röhrt das Gemisch 2 Stunden bei 100 °, saugt heiß ab und dampft das Filtrat ein. Der Rückstand wird über Kieselgel chromatographiert (Laufmittel Essigester/Methanol 4 : 1). Zur Verseifung und Decarboxylierung wird das Produkt 7 Stunden in conc. Salzsäure unter Rückfluß erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird eingedampft. Man erhält ein hellbraunes Öl.

DC (Kieselgel Essigester/Methanol 2 : 1)

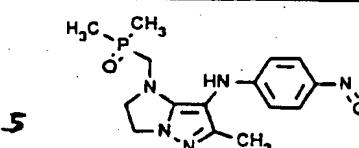
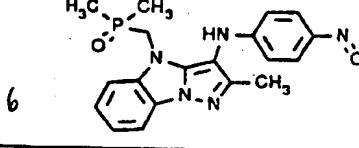
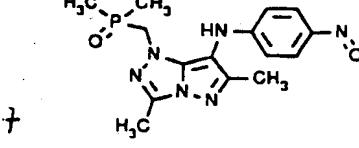
$R_f = 0.37$

Die Umwandlung des oben erhaltenen Produktes in die 3-Aminoverbindung erfolgt analog dem in Beispiel 8 für die entsprechende 3-Aminopyrazolo-[1.5a]-imidazol beschriebenen Verfahren (8b). Man erhält die Titelverbindung als Hydrochlorid vom Fp. 225 ° (Zersetzung).

DC (Kieselgel Essigester/Methanol 3 : 1)

$R_f = 0.2$

Tabelle 4

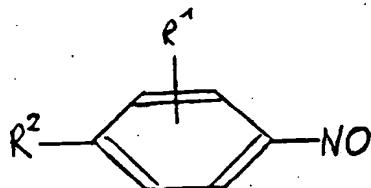
	Struktur	Fp. (°C)	Bemerkungen
15		212 - 215 (Zers.)	DC (Kieselgel) $R_f = 0.5$ Essigester/Aceton/Eisessig/Wasser 50 : 25 : 12.5 : 12.5
20		222 - 224	DC (Kieselgel) $R_f = 0.19$ Methylenchlorid/Methanol 20 : 1
25		ab 132 (Zers.)	DC (Kieselgel) $R_f = 0.24$ Essigester/Methanol 4 : 1

40 Patentansprüche

1. Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung eines Analyten mittels enzymatischer Oxidation des Analyten mit einer Oxidoreduktase in Gegenwart eines direkten Elektronenakzeptors aus der Gruppe der elektronenreichen aromatischen Nitrosoverbindungen und Bestimmung des reduzierten Elektronen-akzeptorS durch Farbbildung als Maß für die Menge des Analyten, dadurch gekennzeichnet, daß die elektronenreiche aromatische Nitrosoverbindung unter Oxidation des Analyten in Gegenwart einer PQQ-abhängigen Dehydrogenase zu einer Iminoverbindung reduziert wird und diese ohne enzymatische Weiterreduktion zum aromatischen Amin durch Farbbildung nachgewiesen wird.
- 50 2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Iminoverbindung durch Reaktion mit einem nichtoxidativen farbgebenden Nachweisreagenz kolorimetrisch bestimmt wird.
3. Verfahren gemäß Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als aromatische Nitrosoverbindung eine Verbindung der Formel I eingesetzt wird.

55 Wobei R¹

I



10

Wasserstoff, Hydroxy, Alkyl gegebenenfalls substituiert durch Hydroxy, COOH oder PO_3H_2 , SO_3H , Alkoxy, Alkylthio, Aryloxy, Arylthio, Halogen, oder Amino, das gegebenenfalls ein- oder mehrfach durch Alkyl, gegebenenfalls substituiert durch Hydroxy, PO_3H_2 Dialkylphosphinyl, SO_3H oder CO_2H , substituiert ist, bedeutet

15

und R_2

eine Hydroxygruppe, Alkoxy, Aryloxy-, Arylthio- oder Alkylthiogruppe bedeutet, wobei der Alkylrest gegebenenfalls seinerseits durch eine Hydroxygruppe, eine Alkoxygruppe, eine gegebenenfalls ein- oder mehrfach durch Alkyl substituierte Aminogruppe, PO_3H_2 , SO_3H oder CO_2H als solche oder in Salzform als Ammonium-, Alkali- oder Erdalkalisalze substituiert ist,

20

oder eine Aminogruppe NR_3R_4 bedeutet,

in der R^3 und R^4 gleich oder verschieden sein können, und Wasserstoff, eine Aryl- oder Alkylgruppe, die ihrerseits durch eine Hydroxy-, Alkoxy-, Hydroxalkoxy-, eine gegebenenfalls hydroxysubstituierte Polyalkoxygruppe, PO_3H_2 , SO_3H , COOH als solche oder in Salzform oder durch eine gegebenenfalls ein oder mehrfach durch Alkyl substituierte Aminogruppe substituiert sein kann, bedeutet, oder

25

in der R^3 und R^4 einen Alkylenrest darstellen können, der gegebenenfalls durch Sauerstoff, Schwefel oder Stickstoff unterbrochen ist, wobei Stickstoff durch einen Alkyl-, Hydroxyalkyl-, Hydroxalkoxyalkyl-, Alkoxyhydroxyalkyl-, Alkoxy carbonylalkyl-, Dioxanylalkyl- oder Polyalkoxyalkylrest substituiert ist, der seinerseits jeweils gegebenenfalls im Alkylteil durch einen Hydroxyrest substituiert sein kann, oder wenn R^1 in ortho-Stellung zu NR^3R^4 steht, R^3 oder R^4 auch zusammen mit R^1 einen Alkylenrest darstellen kann.

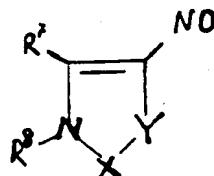
30

4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als aromatische Nitrooverbindung eine Verbindung der Formel II eingesetzt wird.

in der

35

40



50

X-Y $\text{NR}^5\text{-CO}$ oder N=CR^6 bedeutet, wobei
 R^5 H, Alkyl gegebenenfalls substituiert durch Hydroxy, Carboxy, SO_3H , PO_3H_2 , Dialkylphosphinyl

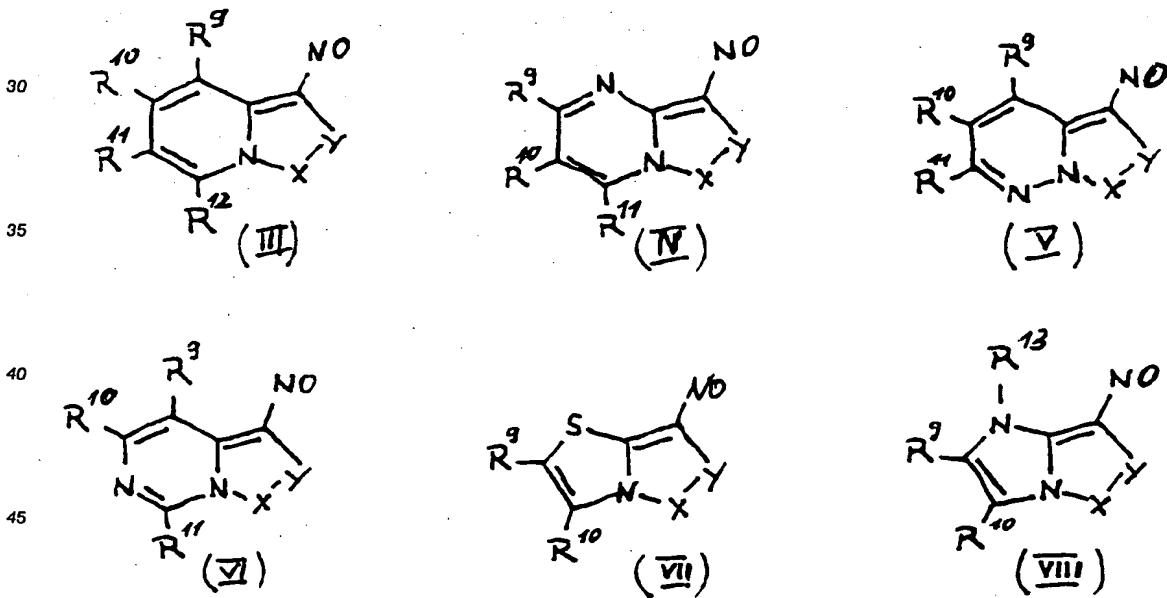
R^6 H, Alkyl, Alkenyl, Alkoxy, Alkylthio, Aryl, Arylthio, Aralkyl, gegebenenfalls jeweils substituiert durch Hydroxy, Dialkylphosphinyl, Carboxy, SO_3H , PO_3H_2 , ein Salz eines dieser Säurereste oder/und Alkoxy carbonyl; oder

55

Amino, das gegebenenfalls durch einen oder zwei gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy- oder/und Alkoxy carbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist wobei, wenn Amino durch 2 Alkylreste substituiert ist, diese Reste auch zu einem Ring geschlossen sein können, der außer durch das N-Atom der Aminogruppe gegebenenfalls auch durch Sauerstoff, Schwefel oder ein weiteres Stickstoffatom unterbrochen durch einen oder zwei Alkylgruppen, Alkoxy- oder/und Aralkoxy carbonylgruppen, $\text{H}_2\text{N-CO}$, Alkyl, Aralkyl- oder/und Aryl carbamoylgruppen substituiert ist; oder Wasserstoff, Carboxy, Alkoxy carbonyl, Carboxamido oder Halogen ist und

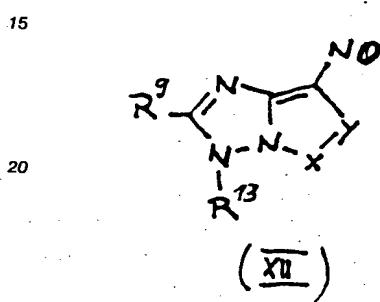
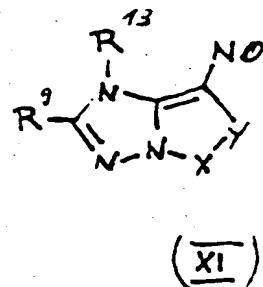
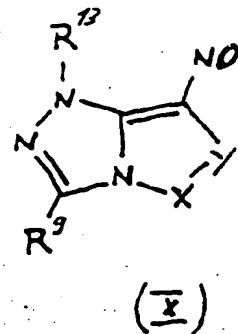
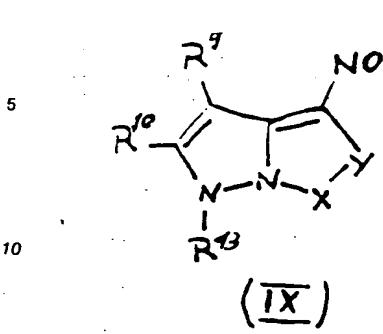
R^7 Alkyl, Thioalkyl oder Aralkyl, gegebenenfalls substituiert durch Hydroxy, Carboxy,

SO₃H oder PO₃H₂ oder
Amino, das gegebenenfalls durch eine oder zwei Alkylgruppen substituiert ist, die wiederum durch Hydroxy, Carboxy, SO₃H, Dialkylphosphinyl oder PO₃H₂ substituiert sein können bedeutet wobei mindestens R⁶ und/oder R⁷ eine Aminogruppe darstellt
5 R⁸ eine Alkyl oder Aralkylgruppe darstellt, die gegebenenfalls durch Hydroxy, Carboxy, SO₃H oder PO₃H₂ substituiert sein kann
oder wobei
R⁷ und R⁸ eins gesättigte oder eine ungesättigte Kette mit 3 oder 4 Gliedern aus Stickstoffatomen oder aus Kohlenstoffatomen und gegebenenfalls einem oder mehreren Stickstoff- oder Schwefelatomen darstellt, wobei Kohlenstoffatome gegebenenfalls substituiert sind durch Alkyl, Alkoxy, Alkylthio, Hydroxy, Aralkyl, Aryl, Carboxy, Carboxamido, Alkoxy carbonyl, Cyano, Halogen, Amino, das gegebenenfalls durch einen oder zwei, gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy- Carboxy- oder/und Alkoxy carbonylreste tragende Arylreste substituiert ist, und wobei Stickstoffatome, die nicht über eine Doppelbindung gebunden sind, durch Alkyl oder Aralkyl, gegebenenfalls durch Hydroxy, SO₃H, PO₃H₂, Carboxy oder Dialkylphosphinyl substituiert, substituiert sind oder zwei benachbarte Kettensubstituenten gegebenenfalls eine Alkylengruppe bilden, die ihrerseits gegebenenfalls mit Aryl substituiert oder anelliert ist
10 oder gegebenenfalls entsprechende tautomere Formen und deren Salze
15 sowie gegebenenfalls mit Aryl substituiert oder anelliert ist
20 5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß als aromatische Nitrosoverbindung eine Verbindung eingesetzt wird, in der R⁷ und R⁸ eine gesättigte oder ungesättigte Kette bilden.
25 6. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß als aromatische Nitrosoverbindung eine Verbindung der Formel III - XII eingesetzt wird.



50

55

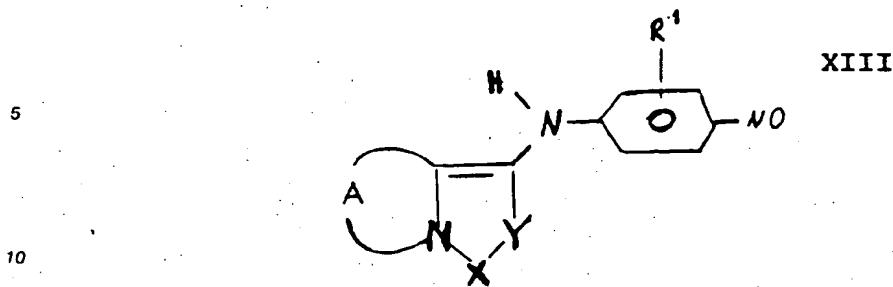


wobei

R⁹, R¹⁰, R¹¹ und R¹², die gleich oder verschieden sind, für Wasserstoff, Hydroxy, Alkyl, Alkoxy, Alkylothio, Aralkyl, Aryl, Carboxy, Alkoxycarbonyl, Carboxamido, Cyano, Amino, das gegebenenfalls durch ein oder zwei gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy- oder/und Alkoxycarbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist oder Halogen stehen, wobei zwei benachbarte Reste gegebenenfalls eine Alkylengruppe bilden, die ihrerseits gegebenenfalls mit Aryl substituiert oder anelliert ist und R¹³ Alkyl oder Aralkyl darstellt, das gegebenenfalls durch Hydroxy, Carboxy, SO₃H, PO₃H₂ oder Dialkylphosphinyl substituiert sein kann.

35

7. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das nicht-oxidative farbgebende Nachweisreagenz ein Kupplungsreagenz für Iminoverbindungen ist.
8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Kupplungsreagenz ein Phenol-, Naphthol-, Anilin- oder ein Naphthylamiderivat eingesetzt wird.
9. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Kupplungsreagenz 2,4,6-Tribrom-3-hydroxybenzoësäure, 2,4-Dibrom-1-naphthol oder 1-Naphthol-4-sulfonsäure eingesetzt wird.
- 45
10. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Iminoverbindung durch Oxidation eines Leukofarbstoffes zu einem Farbstoff nachgewiesen wird.
11. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß als Leukofarbstoff Diarylimidazole, Triarylimidazole oder Naphthylamine verwendet werden.
- 50
12. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine aromatische Nitrosoanilinverbindung der allgemeinen Formel XIII.



eingesetzt wird, in der

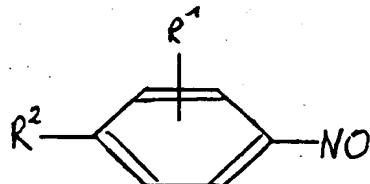
- 5 R¹ Wasserstoff, Hydroxy, Halogen, Alkoxy, Alkylthio, Aryloxy oder Arylthio, Alkyl gegebenenfalls substituiert durch Hydroxy, Carboxy, PO₃H₂, oder SO₃H, Amino gegebenenfalls ein- oder mehrfach substituiert durch Alkyl, das wiederum gegebenenfalls durch Hydroxy, PO₃H₂ Dialkylphosphinyl, SO₃H oder Carboxy substituiert sein kann, bedeutet und
- 10 X-Y NR⁵-CO oder N = CR⁶ darstellt, wobei
- 15 R⁵ H, Alkyl gegebenenfalls substituiert durch Hydroxy, Carboxy, SO₃H, PO₃H₂, Dialkylphosphinyl und
- 20 R⁶ H, Alkyl, Alkenyl, Alkoxy, Alkylthio, Aryl, Arylthio, Aralkyl, gegebenenfalls jeweils substituiert durch Hydroxy, Carboxy, SO₃H, PO₃H₂, ein Salz eines dieser Säurereste oder/und Alkoxy carbonyl; oder
- 25 Amino, das gegebenenfalls durch einen oder zwei gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy- oder/und Alkoxy carbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist, wobei wenn Amino durch 2 Alkylreste substituiert ist, diese Reste auch zu einem Ring geschlossen sein können, der außer durch das N-Atom der Aminogruppe gegebenenfalls auch durch Sauerstoff, Schwefel oder ein weiteres Stickstoffatom unterbrochen sein kann oder Amino, das gegebenenfalls durch ein oder zwei Acylgruppen, Alkoxy- oder/und Aralkoxy carbonylgruppen, H₂N-CO, Alkyl-, Aralkyl- oder/und Arylcarbamoylgruppen substituiert ist; oder Carboxy, Alkoxy carbonyl, Carboxamido oder Halogen ist und
- 30 A eine gesättigte oder ungesättigte Kette aus drei Gliedern mit einem Stickstoff- oder Schwefelatom und zwei Kohlenstoffatomen oder zwei Stickstoffatomen und einem Kohlenstoffatom darstellt, wobei Kohlenstoffatome gegebenenfalls substituiert sind durch Alkyl, Alkoxy, Alkylthio, Hydroxy, Aralkyl, Aryl, Carboxy, Carboxamido, Alkoxy carbonyl, Cyano, Halogen, Amino, das gegebenenfalls durch einen oder zwei, gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy-, oder/ und Alkoxy carbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist, und wobei Stickstoffatome, die nicht über eine Doppelbindung gebunden sind, durch Wasserstoff, Alkyl, gegebenenfalls substituiert durch SO₃H₂, PO₃H₂ Carboxy oder Dialkylphosphinyl, oder durch Aralkyl substituiert sind oder zwei benachbarte Ketten substituenten gegebenenfalls eine Alkylengruppe bilden, die ihrerseits gegebenenfalls mit Aryl substituiert oder anelliert ist, sowie gegebenenfalls entsprechende tautomere Formen und deren Salze,
- 35 die enzymatisch zu einem farbigen Chinondiimin reagiert, das kolorimetrisch als Maß für die Menge des Analyten bestimmt wird.
- 40 13. Verfahren gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß A mit dem benachbarten Heterocyclus einen Imidazol-, Triazol-, Benzimidazol-, Thiazol- oder Dihydroimidazol-Ring bildet.
- 45 14. Verfahren gemäß Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß die aromatische Nitrosoverbindung in einer Konzentration von höher als 10-3 mol/l eingesetzt wird.

- 50 15. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-14, dadurch gekennzeichnet, daß als PQQ-abhängige Dehydrogenase Glukose-dye-oxidoreduktase zur Bestimmung von Glukose eingesetzt wird.
- 55 16. Mittel zur kolorimetrischen Bestimmung eines Analyten durch enzymatische Oxidation des Analyten enthaltend eine PQQ-abhängige Dehydrogenase und eine elektronenreiche aromatische Nitrosoverbindung, dadurch gekennzeichnet, daß es weiterhin ein farbbildendes nichtoxidatives Nachweisreagenz für Iminoverbindungen enthält.

17. Mittel gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Nitrosoverbindung der allgemeinen Formel I enthält,
wobei R¹

5

10



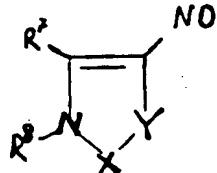
Wasserstoff, Hydroxy, Alkyl gegebenenfalls substituiert durch Hydroxy COOH, PO₃H₂ oder SO₃H, Alkoxy, Alkylthio, Aryloxy, Arylthio, Halogen, oder Amino, das gegebenenfalls durch Hydroxy, PO₃H₂ Diaalkylphosphinyl, SO₃H oder CO₂H, substituiert ist, bedeutet und R²

eine Hydroxygruppe, Alkoxy, Aryloxy-, Arylthio- oder Alkylthiogruppe bedeutet, wobei der Alkylrest gegebenenfalls seinerseits durch eine Hydroxygruppe, eine Alkoxygruppe, eine gegebenenfalls ein- oder mehrfach durch Alkyl substituierte Aminogruppe, PO₃H₂, SO₃H oder CO₂H als solche oder in Salzform als Ammonium-, Alkali- oder Erdalkalisalze substituiert ist, oder eine Aminogruppe NR³R⁴ bedeutet,

in der R³ und R⁴ gleich oder verschieden sein können, und Wasserstoff, eine Aryl- oder Alkylgruppe, die ihrerseits durch eine Hydroxy-, Alkoxy-, Hydroxyalkoxy-, eine gegebenenfalls hydroxysubstituierte Polyalkoxygruppe PO₃H₂, SO₃H oder CO₂H als solche oder in Salzform oder durch eine gegebenenfalls einoder mehrfach durch Alkyl substituierte Aminogruppe substituiert sein kann, bedeutet, oder in der R³ und R⁴ einen Alkylenrest darstellen können, der gegebenenfalls durch Sauerstoff, Schwefel oder Stickstoff unterbrochen ist, wobei Stickstoff durch einen Alkyl-, Hydroxyalkyl-, Hydroxyalkoxyalkyl-, Alkoxyhydroxyalkyl-, Alkoxycarbonylalkyl-, Dioxanylyl-alkyl- oder Polyalkoxylalkylrest substituiert ist, der seinerseits jeweils gegebenenfalls im Alkylteil durch einen Hydroxyrest substituiert sein kann, oder wenn R¹ in ortho-Stellung zu NR³R⁴ steht, R³ oder R⁴ auch zusammen mit R¹ einen Alkylenrest darstellen kann.

18. Mittel gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Nitrosoverbindung der allgemeinen Formel II enthält, in der

40



II

45

X-Y NR⁵-CO oder N=CR⁶ bedeutet, wobei

R⁵ H, Alkyl gegebenenfalls substituiert durch Hydroxy, Carboxy, SO₃H, PO₃H₂, Diaalkylphosphinyl

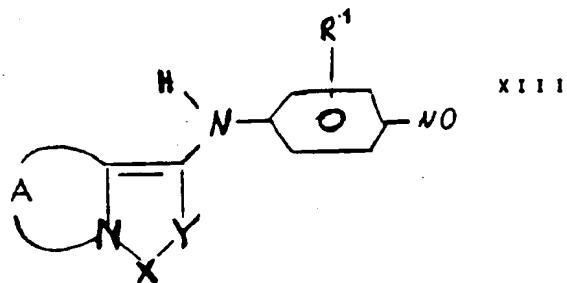
R⁶ H, Alkyl, Alkenyl, Alkoxy, Alkylthio, Aryl, Aralkyl, gegebenenfalls jeweils substituiert durch Hydroxy, Diaalkylphosphinyl, Carboxy, SO₃H, PO₃H₂, ein Salz eines dieser Säurereste oder/und Alkoxy carbonyl; oder

Amino, das gegebenenfalls durch einen oder zwei gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy- oder/und Alkoxy carbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist, wobei, wenn Amino durch 2 Alkylreste substituiert ist, diese Reste auch zu einem Ring geschlossen sein können, der außer durch das N-Atom der Aminogruppe gegebenenfalls auch durch Sauerstoff, Schwefel oder ein weiteres Stickstoffatom unterbrochen sein kann oder Amino, das gegebenenfalls durch ein oder zwei Acylgruppen, Alkoxy-, oder / und Aralkyl- oder/und Aralkoxycarbonylgruppen, H₂N-CO, Achyl-, Arylcarbamoylgruppen substituiert ist; oder Was-

R⁷ serstoff, Carboxy, Alkoxy carbonyl, Carboxamido oder Halogen ist und Alkyl, Thioalkyl oder Aralkyl, gegebenenfalls substituiert durch Hydroxy, Carboxy, SO₃H oder PO₃H₂ oder Amino, das gegebenenfalls durch eine oder zwei Alkylgruppen substituiert ist, die wiederum durch Hydroxy, Carboxy, SO₃H Dialkylphosphinyl oder PO₃H₂ substituiert sein können bedeutet wobei mindestens R⁶ und/oder R⁷ eine Aminogruppe darstellt eine Alkyl oder Aralkylgruppe darstellt, die gegebenenfalls durch Hydroxy, Carboxy, SO₃H oder PO₃H₂ substituiert sein kann oder wobei R⁷ und R⁸ eine gesättigte oder eine ungesättigte Kette mit 3 oder 4 Gliedern aus Stickstoffatomen oder aus Kohlenstoffatomen und gegebenenfalls einem oder mehreren Stickstoff- oder Schwefelatomen darstellt, wobei Kohlenstoffatome gegebenenfalls substituiert sind durch Alkyl, Alkoxy, Alkylthio, Hydroxy, Aralkyl, Aryl, Carboxy, Carboxamido, Alkoxy carbonyl, Cyano, Halogen, Amino, das gegebenenfalls durch einen oder zwei, gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy- Carboxy- oder/und Alkoxy carbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist, und wobei Stickstoffatome, die nicht über eine Doppelbindung gebunden sind, durch Alkyl oder Aralkyl gegebenenfalls substituiert durch Hydroxy, SO₃H, PO₃H₂, Carboxy oder Dialkylphosphinyl substituiert, substituiert sind oder zwei benachbarte Kettensubstituenten gegebenenfalls eine Alkylengruppe bilden, die ihrerseits gegebenenfalls mit Aryl substituiert oder anelliert ist sowie gegebenenfalls entsprechende tautomere Formen und deren Salze

25 19. Mittel gemäß einem der Ansprüche 16-18, dadurch gekennzeichnet, daß es als nichtoxidatives Nachweisreagenz für Iminoverbindungen ein chromogenes Kupplungsreagenz für Iminoverbindungen oder einen Leukofarbstoff enthält.

30 20. Mittel zur kolorimetrischen Bestimmung eines Analyten durch enzymatische Oxidation des Analyten enthaltend eine PQQ-abhängige Dehydrogenase und eine elektronenreiche aromatische Nitrosoverbindung, dadurch gekennzeichnet, daß die elektronenreiche aromatische Nitrosoverbindung eine Nitroso-anilinverbindung der Formel XIII ist,



45	wobei	
	R¹	Wasserstoff, Hydroxy, Halogen, Alkoxy oder Alkylthio, Aryloxy, Arylthio, Alkyl, gegebenenfalls substituiert durch Hydroxy, Carboxy, PO ₃ H ₂ , oder SO ₃ H, Amino gegebenenfalls ein- oder mehrfach substituiert durch Alkyl, das wiederum gegebenenfalls durch Hydroxy, PO ₃ H ₂ Dialkylphosphinyl, SO ₃ H oder Carboxy substituiert sein kann, bedeutet und
50	X-Y	NR ⁵ -CO oder N = CR ⁶ darstellt, wobei
	R⁵	H, Alkyl gegebenenfalls substituiert durch Hydroxy, Carboxy, SO ₃ H, PO ₃ H ₂ oder Dialkylphosphinyl
55	R⁶	H, Alkyl, Alkenyl, Alkoxy, Alkylthio, Aryl, Aralithio, Aralkyl, gegebenenfalls jeweils substituiert durch Hydroxy, Dialkylphosphinyl, Carboxy, SO ₃ H, PO ₃ H ₂ , ein Salz eines dieser Säurereste oder/und Alkoxy carbonyl; oder Amino, das gegebenenfalls durch einen oder zwei, gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy- oder/und Alkoxy carbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist wobei diese Reste auch zu einem Ring geschlossen sein können, der außer durch das N-Atom der Aminogruppe gegebenenfalls auch durch Sauerstoff,

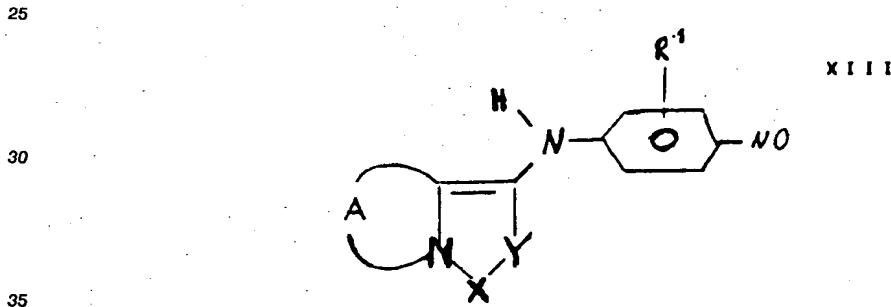
Schwefel oder ein weiteres Stickstoffatom unterbrochen sein kann, oder Amino, das gegebenenfalls durch ein oder zwei Acylgruppen, Alkoxy- oder/und Aralkoxycarbonylgruppen, H₂N-CO, Alkyl, Aralkyl oder/und Arylcaramoylgruppen substituiert ist; oder Carboxy, Alkoxy carbonyl, Carboxamido oder Halogen ist und

5 A eine gesättigte oder ungesättigte Kette aus drei Gliedern mit einem Stickstoff- oder Schwefelatom und zwei Kohlenstoffatomen oder zwei Stickstoffatomen und einem Kohlenstoffatom darstellt, wobei Kohlenstoffatome gegebenenfalls substituiert sind durch Alkyl, Alkoxy, Alkylthio, Hydroxy, Aralkyl, Aryl, Carboxy, Carboxamido, Alkoxy carbonyl, Cyano, Halogen, Amino, das gegebenenfalls durch einen oder zwei, gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy-, oder/und Alkoxy carbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist und wobei Stickstoffatome, die nicht über eine Doppelbindung gebunden sind, durch Wasserstoff, Alkyl, gegebenenfalls substituiert durch SO₃H, PO₃H₂, Carboxy oder Dialkylphosphinyl, oder durch Aralkyl substituiert sind oder zwei benachbarte Kettenstituenten gegebenenfalls eine Alkylengruppe bilden, die ihrerseits gegebenenfalls eine Alkylengruppe bilden, die ihrerseits gegebenenfalls mit Aryl substituiert oder anelliert ist, sowie gegebenenfalls entsprechende tautomere Formen und deren Salze.

21. Mittel gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß A mit dem benachbarten Heterocyclus einen Imidazol-, Triazol-, Benzimidazol-, Thiazol- oder Dihydroimidazol-Ring bildet.

20 22. Testträger enthaltend ein Mittel gemäß einem der Ansprüche 16-21.

25 23. Nitrosoanilinverbindungen der Formel XIII,



wobei

R¹ Wasserstoff, Hydroxy, Halogen, Alkoxy oder Arylthio, Alkyl gegebenenfalls substituiert durch Hydroxy, Carboxy, PO₃H₂, Alkyl, Dialkylphosphinyl oder SO₃H, Amino gegebenenfalls ein- oder mehrfach substituiert durch Alkyl, das wiederum gegebenenfalls durch Hydroxy, PO₃H₂, SO₃H oder Carboxy substituiert sein kann, bedeutet und

X-Y NR⁵-CO oder N=CR⁶ darstellt, wobei

R⁵ H, Alkyl gegebenenfalls substituiert durch Hydroxy, Carboxy, SO₃H, PO₃H₂ oder Dialkylphosphinyl

R⁶ H, Alkyl, Alkenyl, Alkoxy, Alkylthio, Aryl, Aralkyl, gegebenenfalls jeweils substituiert durch Hydroxy, Carboxy, SO₃H, PO₃H₂, ein Salz eines dieser Säurereste oder/und Alkoxy carbonyl; oder Amino, das gegebenenfalls durch einen oder zwei gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy- oder/und Alkoxy carbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist, diese Reste auch zu einem Ring geschlossen sein können, der außer durch das N-Atom der Aminogruppe gegebenenfalls auch durch Sauerstoff, Schwefel oder ein weiteres Stickstoffatom unterbrochen sein kann, oder Amino, das gegebenenfalls durch ein oder zwei Acylgruppen, Alkoxy- oder/und Aralkoxycarbonylgruppen, H₂N-CO, Alkyl-, Aralkyl- oder/und Arylcaramoylgruppen substituiert ist; oder Wasserstoff, Carboxy, Alkoxy carbonyl, Carboxamido oder Halogen ist und

55 A eine gesättigte oder ungesättigte Kette aus drei Gliedern mit einem Stickstoff- oder Schwefelatom und zwei Kohlenstoffatomen oder zwei Stickstoffatomes und einem Kohlenstoffatom darstellt, wobei Kohlenstoffatome gegebenenfalls substituiert sind durch Alkyl, Alkoxy, Alkylthio, Hydroxy, Aralkyl, Aryl, Carboxy, Carboxamido, Alkoxy carbonyl, Cyano,

EP 0 620 283 A1

5 Halogen, Amino, das gegebenenfalls durch einen oder zwei, gegebenenfalls einen oder mehrere Hydroxy-, Carboxy-, oder/und Alkoxycarbonylreste tragende Alkylreste substituiert ist, und wobei Stickstoffatome, die nicht über eine Doppelbindung gebunden sind, durch Wasserstoff, Alkyl, gegebenenfalls substituiert durch SO₃H, PO₃H₂, Carboxyl, Dialkylphosphinyl oder Aralkyl substituiert sind oder zwei benachbarte Kettensubstituenten gegebenenfalls eine Alkylengruppe bilden, die ihrerseits gegebenenfalls mit Aryl substituiert oder anelliert ist, sowie gegebenenfalls entsprechende tautomere Formen und deren Salze.

10 24. Nitrosoanilinverbindungen gemäß Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß A mit dem benachbarten Heterocyklus einen Imidazol-, Triazol-, Benzimidazol-, Thiazol- oder Dihydroimidazol-Ring bildet.

25. Verwendung der Nitrosoanilinverbindungen gemäß einem der Ansprüche 23 oder 24 zur kolorimetrischen enzymatischen Bestimmung eines Analyten.

15

20

25

30

35

40

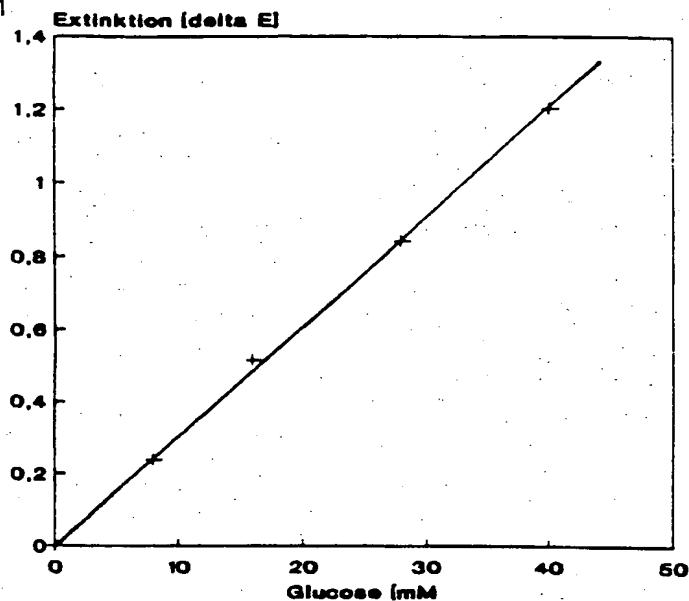
45

50

55

Glucose-Bestimmung mit Gluc DOR
Nachweis über reduktive Kupplung

Fig. 1



Wellenlänge: 606 nm
Zeit: 6 min.

Glucoseabhängige reduktive Kupplung

Fig. 2

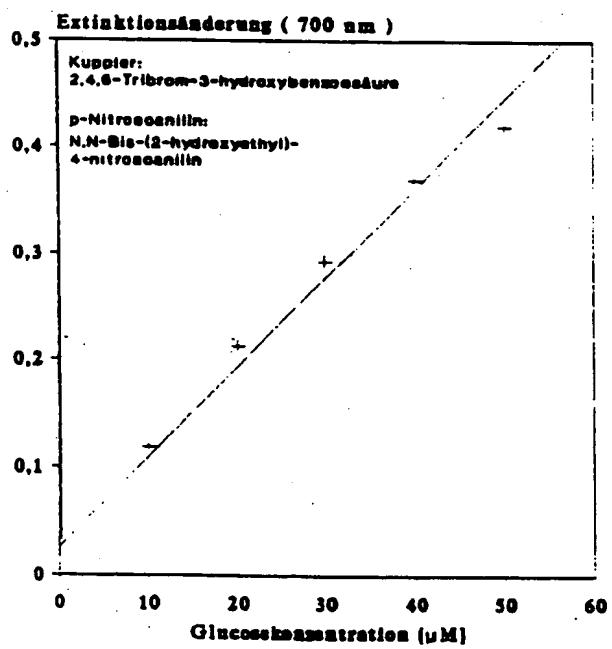


Fig. 3

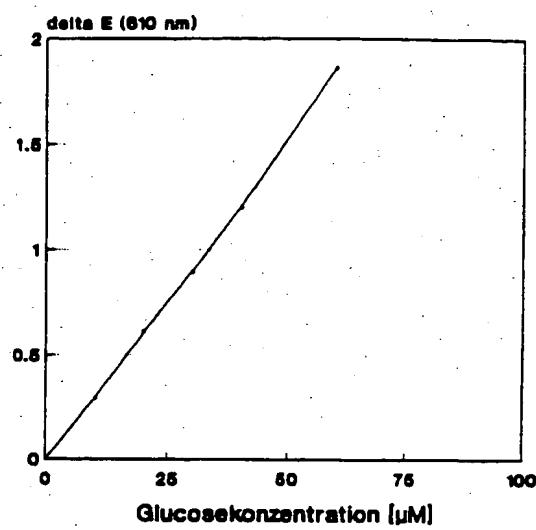
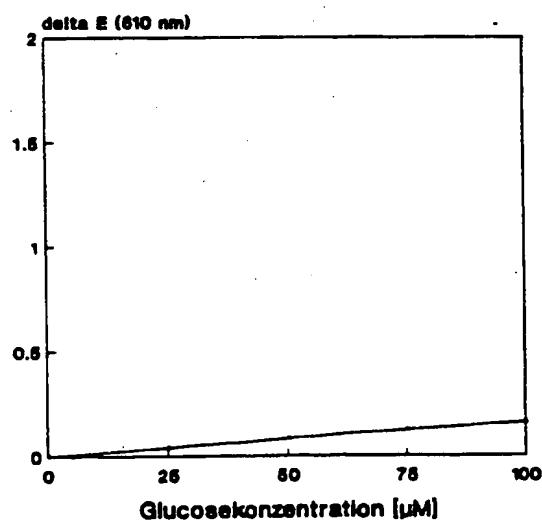


Fig. 4



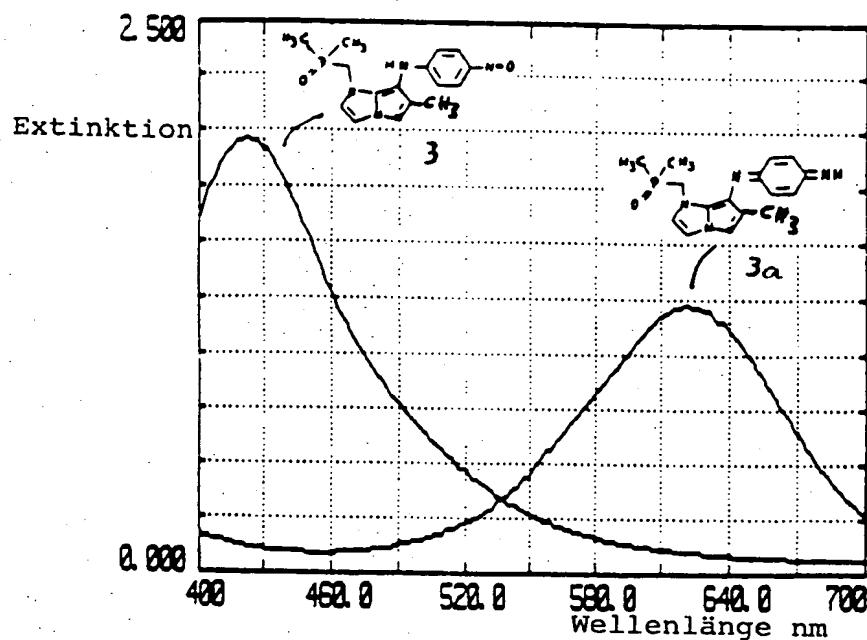


Fig. 5: Spektren von p-Nitrosoanilin (3)
und Chinondiimin (3a)

Glucosebestimmung (mit Mutarotase)

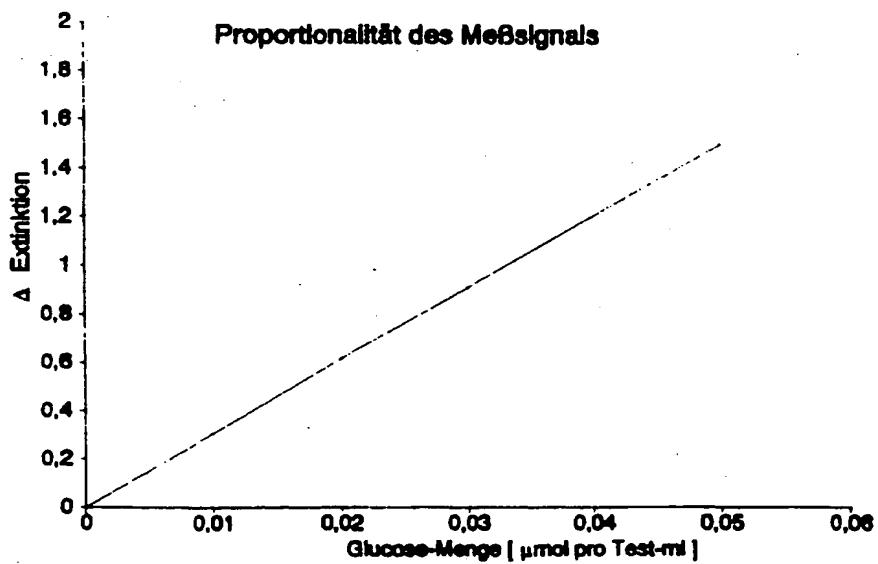


Fig. 6

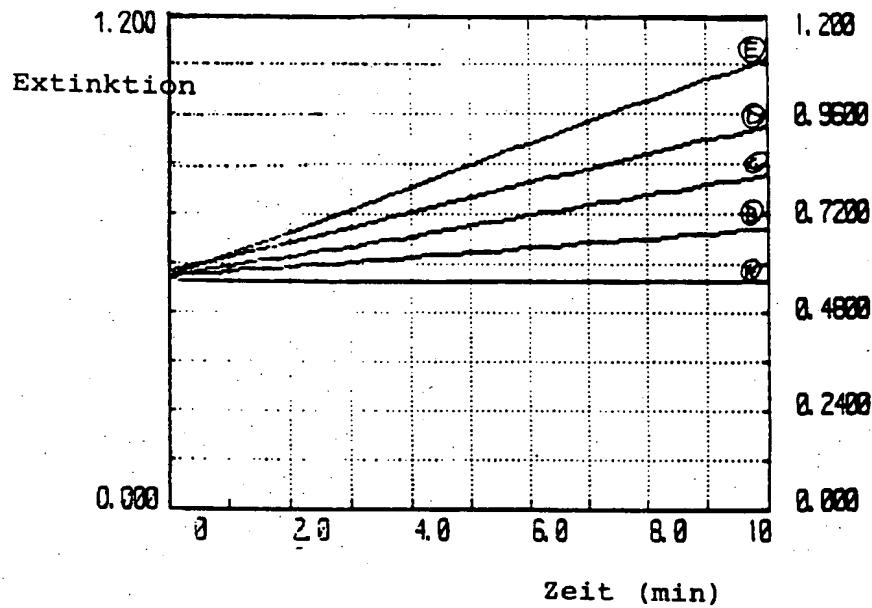


Fig. 7

Enzymaktivität:

- A) 0 μ U/ml
- B) 140 μ U/ml
- C) 280 μ U/ml
- D) 420 μ U/ml
- E) 560 μ U/ml

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.